Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EINES HISTIDIN – ACD – STABILISATORS AUF DEN KOHLENHYDRAT – UND ENERGIESTOFFWECHSEL VON BLUTKONSERVEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Ortrun Foth
aus Balingen

1981

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EINES HISTIDIN – ACD – STABILISATORS AUF DEN KOHLENHYDRAT – UND ENERGIESTOFFWECHSEL VON BLUTKONSERVEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Ortrun Foth
aus Balingen

1981

Dekan: Professor Dr. med. G. Rassner

1. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. W. Heller

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. V. Hempel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	EINFOHRUNG	1
1.2	BLUTKONSERVIERUNG IN ACD-STABILISATOR-LÖSUNG	2
1.3	K- Mg- L- ASPARTAT	6
1.4	HISTIDIN	8
1.5	FRAGESTELLUNG	9
2	MATERIAL UND METHODIK	10
2.1	ZUSAMMENSETZUNG DER STABILISIERUNGS-MITTEL	10
2.2	UNTERSUCHUNGSBEDINGUNGEN	11
2.3	ENZYMATISCH- UND CHEMISCH- OPTISCHE BESTIMMUNG DER PARAMETER	13
2.3.1	Pyruvat	13
2.3.2	Lactat	15
2.3.3	ATP	17
2.3.4	pH- Wert	19
2.3.5	Osmolarität	20
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	20
3	ERGEBNISSE (Tabellarische und graphische Darstellung)	23
3.1	PYRUVAT	23
3.2	LACTAT	26
3.3	ATP	30
3.4	pH- WERT	33
3.5	OSMOLARITÄT	36

4 DISKUSSION 38

4.1 DISKUSSION DER METHODE 38

4.2 DISKUSSION DER EINZELERGEBNISSE 40

4.2.1 pH- Wert 40

4.2.2 Pyruvat und Lactat 41

4.2.3 ATP 46

4.2.4 Osmolarität 48

4.3 VERGLEICH DER STOFFWECHSELWIRKUNGEN UNTER Mg- ASPARTAT- ACD UND HISTIDIN-K- Mg- ASPARTAT- ACD 49

5 ZUSAMMENFASSUNG 50

6 TABELLARISCHER ANHANG 53

7 LITERATURVERZEICHNIS 64

1 EINLEITUNG

1.1 EINFOHRUNG

Seit LANDSTEINERs Beschreibung der Blutgruppen und des Isoagglutinins um die Jahrhundertwende, seit also Gelingen und Nichtgelingen einer Bluttransfusion erklärbar und vorhersehbar wurden, wird an der Entwicklung und Verbesserung des modernen Bluttransfusionswesens gearbeitet. Zunächst galt die Hauptsorge der Flüssigerhaltung des Blutes; die rasch auftretende Gerinnung ließ es nicht zu, größere Blutübertragungen durchzuführen. Es war ein fundamentales Ereignis, als 1914 und 1915 HUSTIN in Belgien und LEWISON in Amerika (24,28) gleichzeitig und unabhängig voneinander die gerinnungshemmende Wirkung des Citrat entdeckten. Dadurch wurden Spender und Empfänger unabhängig voneinander, und Blut konnte auch für Notfälle bereitgehalten werden. Als ROUS und TURNER (24,28,71) 1916 entdeckten, daß Zuckerzusätze die Aufbewahrungszeit der roten Blutkörperchen wesentlich verlängerten, hatte man den ersten Stabilisator gefunden. Die Arbeitsgruppen um MAIZELS und LOUTIT stellten dann 1943 fest, daß sich durch Ansäuerung des Citrat-Dextrose-Gemisches mit Citronensäure die Lagerzeit fast verdoppeln ließ (24,28). Dies führte zur Entwicklung des heute noch verwendeten kombinierten ACD (Acid-Citrat-Dextrose)- Stabilisators. In Deutschland wird der ACD-Stabilisator vorwiegend nach den beiden im amerikanischen Arzneibuch (U.S.P.XV) enthaltenen Formeln A und B verwendet.

Formel A: 22,0 g Natr.citric. neutrale 2 H_2O
8,0 g Acid.citric. H_2O
24,5 g Saccharum amylac.
Aqua pro injectione ad 1 000 ml

Formel B: 13,3 g Natr.citric. neutrale 2 H_2O
4,4 g Acid.citric.
14,7 g Saccharum amylac.
Aqua pro inj. ad 1 000 ml (28)

100 ml dieser Lösung werden mit 400 ml Nativblut im geschlossenen System vermischt. (28,64)

1.2 BLUTKONSERVIERUNG IN ACD-STABILISATORLÖSUNG

Das ACD-Blut kann bei 4°C drei Wochen lang gelagert werden. Nach 21-tägiger Lagerung beträgt die im Durchschnitt noch erzielbare Überlebensrate der Spender-Erythrocyten im Empfänger-Organismus 24 Stunden nach der Transfusion etwa 70% des Ausgangswertes. Dies gilt als untere zulässige Grenze (64). Die Erythrocyten, die nach 24 Stunden noch zirkulieren, haben eine normale Überlebenszeit von ca. 120 Tagen (18,28).

Es bestehen enge Beziehungen zwischen Stoffwechselveränderungen und der Zellalterung der Erythrocyten, wobei Veränderungen des Zellstoffwechsels unter Konservierungsbedingungen grundsätzlich verschieden sind von den Alterungsvorgängen in vivo bzw. sich der physiologischen Alterung noch andere, konservierungsbedingte Veränderungen aufpfropfen (49). Einen "Konservierungsschaden" erleiden vor allem junge Zellen (16). Die roten Blutzellen bleiben in ACD zwar ziemlich lange Zeit intakt, verlieren ihre Lebensfähigkeit aber rapid mit der mechanischen Belastung im Kreislauf nach der Transfusion. Nach 30 bis 35 Tagen Lagerung werden 50% der Zellen innerhalb von 24 Stunden zerstört (24,41).

Die Erhaltung der Struktur der Blutzellen ist abhängig von der Erhaltung des Stoffwechselgleichgewichts in den Zellen (48). In der Blutkonserve ist der natürliche Abtransport der Stoffwechselzwischen- und -end-

produkte verändert; es kommt zur Ansammlung dieser Stoffe, zum Aufbau von Ungleichgewichten innerhalb der Zelle zwischen Membran und löslicher Phase und zwischen Plasma und den Blutzellen. Dadurch wird der normale Stoffwechselablauf gestört, die Zellstruktur bricht zusammen. Ziel der Konservierung ist es, durch temporäre Hemmung des Alterungsprozesses und Zusatz von Substraten und Coenzymen den Stoffwechsel der Blutzellen aufrechtzuerhalten, die Einstellung neuer Stoffwechselgleichgewichte zu ermöglichen bzw. den schädigenden Einfluß von Stoffwechselendprodukten herabzusetzen. Struktur und Funktion der Blutzellen müssen soweit erhalten bleiben, daß sie bei Rückführung in den menschlichen Organismus ihre biologische Funktion eine bestimmte Zeit voll erfüllen können (48).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um herauszufinden, wie Stoffwechselveränderungen und Überlebensrate der roten Blutzellen zusammenhängen. Dabei wurde dem Adenosintriphosphat (ATP) eine dominierende Rolle zuerkannt: Ein Abfall des ATP-Spiegels ist eng verbunden mit einer verminderten Überlebensfähigkeit der Erythrocyten nach der Transfusion (24). In jungen Zellen ist der ATP-Abfall prozentual größer als in älteren (60). Gelingt es, durch Zusatz von Purinnukleosiden den ATP-Spiegel aufrechtzuerhalten bzw. wieder anzuheben, so ist der Konservierungsschaden geringer (1,9,44,49,71,73). Diese Schlüsselrolle des ATP ist leicht einzusehen, wenn man betrachtet, in wie vielen unterschiedlichen Stoffwechselsystemen es aktiv ist und welche regulative Funktion im einzelnen Stoffwechselprozeß es innehat (4,61):

- 1. Beteiligung an der Phosphorylierung von Zucker, vor allem Glucose
- 2. Beteiligung am Transport von K^+ und Na^+
- 3. Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Zellform
- 4. Bindung an Hb und Reduktion seiner O_2-Affinität
- 5. Synthese von Purin- und Pyridinnukleotiden
- 6. Beteiligung an der Regulation der Glycolyse durch allosterische Hemmung der PFK, PGK und PK (5b)
- 7. Reduktion des sich ständig bildenden Met-Hb's

ATP steuert also die Glycolyse, durch die es selbst regeneriert wird. Es wird oben als Coenzym verbraucht, bevor es unten gewonnen wird (5b,7,24,50,52).

Der Energiebedarf zum Aufbau von ATP wird in reifen Erythrocyten zu 80 - 90% aus dem Abbau der Glucose über den EMBDEN-MEYERHOF-Weg gewonnen (48).In konserviertem Blut wird die Glycolyse aber erheblich gebremst (2,4,28,62): Der pH-Wert, der nach Durchmischung mit Spenderblut initial 6,9 - 7,0 betrug (28), fällt im Verlauf der Lagerung durch Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte bis auf 6,6 - 6,5 ab (13,24,62,64,69). Dadurch und durch die niedrige Temperatur (-Glucoseutilisation bei Körpertemperatur: 20 mg/g Hb pro Tag, bei 4^oC: 1 mg/g Hb pro Tag -) wird die Hexokinase-Aktivität, deren pH-Optimum bei 7,8 liegt, gehemmt. Noch wichtiger ist jedoch - im Gegensatz zu früheren Auffassungen, wonach die HK für das entscheidende Schlüsselenzym gehalten wurde - die Suppression der PFK-Aktivität. Die PFK wird durch ATP gehemmt, und zwar wird diese Hemmung bei niedrigerem pH stärker (73). Es resultiert ein verminderter Glucoseverbrauch, ein Absinken des ATP-Spiegels und ein Stop der Reutilisation von anorganischem Phosphat (62,70). Bei der Konservierung spielt also die Abnahme von Substraten und Coenzymen

die Hauptrolle, weniger die Abnahme von Enzymen, im Gegensatz zur physiologischen Alterung, wo die abnehmenden Enzymaktivitäten die begrenzenden Faktoren des Stoffwechsels sind (11,24,49,52). Trotz der geringen Stoffwechselrate der Glycolyse fällt der ATP-Spiegel aber so langsam ab, daß er für mindestens ein bis zwei Wochen nicht unter die kritische Grenze fällt: 2,3 - DPG, das in einem Nebenschluß der Glycolyse, dem RAPOPORT-LUEBERING-Shunt, gebildet wird, dient unter Konservierungsbedingungen als Energiespeicher (4,24,52). Sehr wichtig ist ATP außerdem als Substrat für die membrangebundene S- ATPase (5a,58). Sie transportiert Na in die Zelle hinein, K aus der Zelle heraus. Unter normalen Bedingungen werden 35% des gebildeten ATP für diese Membran- ATPase verbraucht (2). Fällt sie aus oder hat sie nicht genügend Substrat, so kommt es zu einer Verteilungsstörung der Elektrolyte und dadurch zu Störungen im Stoffwechsel und in der Zellform (2). Die Erythrocyten nehmen erst Stechapfelform, später Quellform an. Nach 20 bis 25 Tagen sind 70 bis 75% der Erythrocyten morphologisch verändert (36).

Reduktion von ATP unter einen kritischen Wert führt letztlich zur Unfähigkeit der Zelle, nach der Reinfusion in die Zirkulation zu überleben (60).

Da die roten Blutzellen ihre Energie hauptsächlich aus der anaeroben Glycolyse gewinnen, häufen sich, wie oben schon kurz erwähnt, die Endprodukte der Glycolyse, Pyruvat und Lactat, mit zunehmender Lagerungsdauer immer mehr an (21,22,28,28). Vor allem durch die Lactatbildung kommt es zum pH-Abfall mit seiner negativen Auswirkung auf den energieproduzierenden Stoffwechsel der Erythrocyten und Form und Eigenschaften der Zellmembran (48).

1.3 K-Mg-L-ASPARTAT

K-Mg-L-Aspartat ist ein Chelatkomplex, bei dem ein zentrales Mg-Ion mehrere Bindungen zu zwei Molekülen Asparaginsäure eingeht. Sein Molekulargewicht beträgt 360,60 (61). Alle drei Komponenten dieser Substanz haben wichtige Funktionen im Zellstoffwechsel.

K findet sich zu 98% intrazellulär, zu 2% extrazellulär. In den Erythrocyten beträgt sein Gehalt 100 mval/1 000 g Feuchtgewicht (54), im Plasma ca. 5 mval/l (54). Seine Aufgabe liegt vor allem in der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials.

Mg erfüllt seine Funktionen ebenfalls innerhalb der Zelle: Es liegt zu 99% intrazellulär, nur zu 1% extrazellulär (37). Mengenmäßig steht es in der Zelle an der zweiten Stelle hinter K (67).

K und Mg sind Cofaktor vieler Enzyme des Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Nukleotidstoffwechsels (67). An allen Transphosphorylierungen, in die ATP verwickelt ist, ist Mg beteiligt (15). Z.B. die HK, die PFK, die K- Na- Membran- ATPase und viele andere Enzyme der Glycolyse und anderer Stoffwechselwege werden stimuliert (5a,61). Generell benötigen alle Kinasen Mg als Aktivator. Dadurch ist Mg essentieller Bestandteil im Stoffwechsel der aktiven Phosphate (37,42,61). Mg besitzt große Affinität zu den aktiven Phosphaten und zwar je länger die Phosphatkette, desto größer die Affinität (37).

Außer dem Mg- ATP- Komplex müssen zur Aktivierung eines Enzyms noch andere Ionen gebunden sein, z.B. K (37).

K und Mg steuern den Citratcyclus und stimulieren auch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien (42).

Als die große Bedeutung von K und Mg für den gesamten Funktionsablauf des Körpers bekannt war, wurde versucht, dem Elektrolytverlust bzw. der Stoffwechseldepression der belasteten Zelle dadurch zu begegnen, daß man durch Infusionen K und Mg als Chlorid oder als Salz der Milchsäure zuführte (6). Doch nur die Serumwerte konnten dadurch im Normbereich gehalten werden (6).

Das Problem, daß die Elektrolyte in die Zellen aufgenommen werden, wurde gelöst, indem man Asparaginsäure zugab (6).

Asparaginsäure ist eine Monoaminodicarbonsäure (61). Sie hat folgende Dissoziationskonstanten: pK_1= 1,88; pK_2= 3,65; pK_3 = 9,60; der isoelektrische Punkt liegt bei pH = 2,77 (61). Bei physiologischem pH liegt Asparaginsäure als einwertiges Anion vor (56). Die Asparaginsäure hat eine hohe Affinität zum Intrazellulärraum. Im chelatisierten Zustand kann die L-Form - die Asparaginsäure kommt in zwei optischen Antipoden vor - die Zellmembran durchdringen und dabei Elektrolyte in die Zellen einschleusen; die D-Form greift in den Zellstoffwechsel ein. Sie stimuliert Citratcyclus, Harnstoffcyclus, Purin- und Pyrimidinsynthese (42,63).

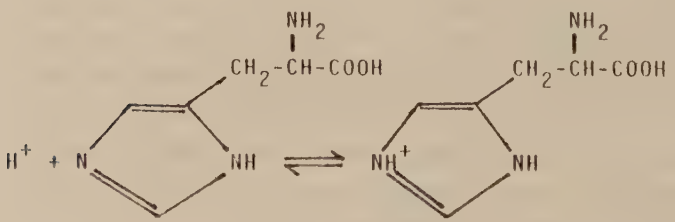
Nachdem in vielen klinischen Anwendungsbereichen positive Erfahrungen durch (K-)Mg- Aspartat- Zufuhr gemacht wurden, untersuchten KLÄGER (31) und SCHAIBLE (61) die Auswirkungen dieser Substanz auf den Stoffwechsel von Konservenblut. KLÄGER stellte eine höhere Glycolyserate in Mg- Aspartat- ACD fest, was sich positiv auf die Blutkonservierung auswirkt, SCHAIBLE dagegen einen früher einsetzenden ATP-Abfall. Daraus, verbunden mit den Veränderungen anderer von ihm bestimmten Parametern, zieht er den Schluß, daß Mg-Aspartat die Verschlechterung des Eigenstoffwechsels von konserviertem Blut eher beschleunigt als den auftretenden Konservierungsschäden begegnet. Da der

pH-Wert im Mg-Aspartat-ACD mit einem Ausgangswert von 6,53 und einem Abfall bis auf 6,28 stark im sauren Bereich lag, erhöhten wir ihn durch Zugabe von Histidin und untersuchten dann, wie sich dies auf den Stoffwechsel von Konservenblut auswirkt.

1.4 HISTIDIN

Histidin ist eine "bedingt essentielle" Aminosäure, d.h. der Erwachsene kann ohne Nahrungshistidin für kürzere Perioden auskommen, das wachsende Kind benötigt aber Histidin (7). Es handelt sich um eine positiv geladene Aminosäure mit nur schwach basischer Imidazolfunktion: Bei pH 6,0 besitzen mehr als 50% der Histidinmoleküle protonierte oder positiv geladene Seitengruppen, bei pH 7,0 dagegen haben weniger als 10% eine positive Ladung (29,34). Bei vielen Enzymen spielt Histidin die Rolle eines Protonendonators und -acceptors (29).

Vor allem seine Imidazoliumgruppe trägt zur Pufferwirkung des Histidin bei:



Die Dissoziationskonstanten betragen pK_1 = 1,78 (Carboxylgruppe), pK_2 = 5,97 (Imidazolrest), pK_3 und pK_4 = 8,97 (Seitengruppe) (14); der isoelektrische Punkt liegt bei pH = 7,6 (14). (7)

Histidin ist die einzige Aminosäure mit merklicher Pufferkapazität bei pH 6,0 bis 8,0, also im physiologischen pH-Bereich (34).

1.5 FRAGESTELLUNG

Wegen dieser Pufferwirkung setzten wir das Histidin den ACD-Blutkonserven zu, um zu untersuchen, ob dieses in der Lage ist, die Säuerung während der Konservierung aufzufangen, und welche weiteren Auswirkungen sich daraus auf die Glycolyse und damit vor allem die Energiebildung ergeben. Ich untersuchte hierzu die Parameter pH, Pyruvat, Lactat, ATP und Osmolarität, meine Kollegin H. MUNZ zusätzlich die Parameter Glucose und Aldolase und die Elektrolyte Mg und Zn.

2 MATERIAL UND METHODIK

Wir untersuchten lagerungsbedingte Veränderungen in Blutkonserven, die drei unterschiedliche Stabilisierungsmittel enthielten:

Stabilisierungsmittel I	ist der herkömmliche ACD-Stabilisator (s.1.1)
Stabilisierungsmittel II	enthält zusätzlich K-Mg-Aspartat und Histidin
Stabilisierungsmittel III	enthält ebenfalls zusätzlich K-Mg- Aspartat, aber die doppelte Histidinkonzentration wie Stabilisierungsmittel II

Die Untersuchungen mit Stabilisierungsmittel II führten wir selbst durch. Die Untersuchungen mit Stabilisierungsmittel I und III wurden zu einem früheren Zeitpunkt im Forschungslabor der Chirurgischen Klinik Tübingen durchgeführt und die Ergebnisse uns als Vergleichsbasis (Stabilisierungsmittel I) bzw. zur Ausarbeitung (Stabilisierungsmittel III) übergeben.

2.1 ZUSAMMENSETZUNG DER STABILISIERUNGSMITTEL

Nach den Angaben der Dr. FRANZ KÖHLER Chemie, Alsbach / Bergstraße, sind Stabilisierungsmittel II und III wie folgt zusammengesetzt:

Stabilisierungsmittel II:

18,93 g tri-Mg-Citrat
8,64 g Glucose-Hydrat
5,76 g Citronensäure
24,00 g Mg-L-Aspartat
24,00 g K-L-Aspartat
6,08 g L-Histidin-Base
1,38 g L-Histidin-Hydrochlorid
Aqua pro inj. ad 1 000 ml

Stabilisierungsmittel III:

18,93 g tri-Mg-Citrat
8,64 g Glucose-Hydrat
5,76 g Citronensäure
24,00 g Mg-L-Aspartat
24,00 g K-L-Aspartat
12,16 g L-Histidin-Base
2,76 g L-Histidin-Hydrochlorid
Aqua pro inj. ad 1 000 ml

2.2 UNTERSUCHUNGSBEDINGUNGEN

Das Blut für unsere Untersuchungen stammte von 24 gesunden Freiwilligen im Alter von 18 bis 35 Jahren, 9 Männern und 15 Frauen. (Mittleres Hb der Männer: 15,31 mit s = 1,17; mittleres Hb der Frauen: 12,66 mit s = 1,06; mittlerer Hk der Männer: 44,12 mit s = 2,83; mittlerer Hk der Frauen: 37,63 mit s = 2,79.)

An vier Tagen baten wir je sechs Probanden ca. zwei bis drei Stunden nach dem Frühstück ins Labor und entnahmen jedem mit dem üblichen Transfusionsbesteck aus der Cubitalvene 8 Flaschen Blut. In diesen befand sich - von der Firma Dr. FRANZ KÖHLER bereits fertig geliefert - 15,625 ml des Stabilisierungsmittels II. Durch den in der Flasche herrschenden Unterdruck wurde ca. 50 ml Venenblut abgenommen, so daß jeder Proband

ca. 400 ml Blut spendete.

Nachdem alle Flaschen gefüllt waren, wurde jeweils noch ein Reagenzglas zur Hb- und Hk-Bestimmung für das Routine-Labor gefüllt. Die Flaschen wurden sofort nach der Entnahme und nachdem Blut und Stabilisierungsmittel durch sanftes Umdrehen gut durchmischt waren, in Eis- Wasserbad gekühlt und dann in einer erschütterungsfreien Kühlzelle bei $4^{o}C$ bis zum Untersuchungstermin gelagert.

Aus je einer Flasche wurden die oben genannten Parameter am 1., 3., 7. und 21. Tag der Lagerung bestimmt. Dabei wurde an jedem Bestimmungstag eine neue Flasche benutzt, da bei Verwendung von nur einer Flasche der Einstrom von Sauerstoff zu Stoffwechselveränderungen geführt hätte. Die übrigen vier Flaschen wurden dem Labor zur Bestimmung anderer Parameter überlassen.

Am Untersuchungstag wurde über den Gummipfropfen mit einer 1 ml Plastik-Einmalspritze entsprechend den Bestimmungsansätzen Blut entnommen und durch Perchlorsäure enteiweißt und hämolysiert. Serum und Plasma gewannen wir durch zweimaliges Zentrifugieren des Konservenblutes bei ca. 5 000 U/min. Durch Umleeren in bereitgestellte Reagenzgläser wurden die Oberstände sofort vom Blutkuchen getrennt.

Die weiteren Untersuchungsschritte erfolgten wie unten angegeben.

Für die Bestimmung der Pyruvat,Lactat- und ATP-Konzentrationen diente Blut als Probenmaterial; die Bestimmung des pH-Wertes und der Osmolarität erfolgte im Plasma.

Im Fall der Konservierung mit Stabilisierungsmittel I wurde Blut von ebenfalls 24 Freiwilligen untersucht, bei den Konserven mit Stabilisierungsmittel III waren

es nur 9 Probanden. Untersuchungsmethoden und Lagerungsdauer waren entsprechend den Untersuchungen, die wir selbst durchführten.

2.3 ENZYMATISCH- UND CHEMISCH- OPTISCHE BESTIMMUNG DER PARAMETER

Für die Bestimmung der Konzentrationen von Pyruvat, Lactat und ATP verwendeten wir die jeweilige Testkombination der Firma BOEHRINGER Mannheim GmbH. Zentrifugiert wurde in einer Kühlzentrifuge mit 5 000 U/min bei $4^{o}C$. Zum Pipettieren benutzten wir EPPENDORF- Pipetten; die photometrischen Messungen wurden in einem ZEISS Spektralphotometer PMQ_2 durchgeführt, wobei zur kontinuierlichen Messung der Extinktionsabnahme bei Pyruvat und ATP ein linearisierender Schreiber angeschlossen war.

2.3.1 Pyruvat

Es wurde nach der Methode nach CZOK und LAMPRECHT in H.U. BERGMEYER verfahren.

Testprinzip:

Unter der katalysierenden Wirkung des Enzyms Lactatdehydrogenase wird das Pyruvat zu L-Lactat reduziert.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + NAD^+$$

Unter optimalen Meßbedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion ausreichend weit auf der rechten Seite, so daß ein quantitativer Umsatz garantiert ist. Das während der Reaktion verbrauchte NADH ist der umgesetzten Pyruvatmenge äquivalent und dient als Meßgröße. Seine Absorption wird bei 366 nm gemessen.

Herstellung der Lösungen:

1 Puffer: Trikaliumphosphat 0,7 Mol/l
Inhalt mit 35 ml dest. Wasser lösen

2 NADH 2,5 mMol/l
Inhalt mit 4 ml dest. Wasser lösen

3 LDH $\geq$ 900 U/ml
Inhalt unverdünnt verwenden

Probenvorbereitung

Enteiweißung:
Perchlorsäure (eiskalt; ca. 1,0 N) 4,0 ml
Blut 4,0 ml

Gut mischen, zweimal 10 min. bei ca. 5 000 U/min. zentrifugieren.
In ein Reagenzglas pipettieren:

Überstand	3,0 ml
Lösung 1	1,5 ml

Mischen, ca. 15 min. im Eis-Wasserbad stehen lassen, dann nochmals 10 min. bei ca. 5 000 U/min. zentrifugieren, Oberstand abgießen.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: Hg 366 nm
Küvette: 1 cm Schichtdicke
Inkubationstemperatur: 25°C
Messung gegen Luft (Extinktionsabnahme)

In eine Küvette pipettieren:

Filtrat (25°C)	2,00 ml
Lösung 2	0,20 ml

mit Plastikspatel mischen, Extinktion E_1 messen

Suspension 3	0,02 ml

Mischen, Stillstand der Reaktion abwarten, Extinktion E_2 messen. $E_1 - E_2 = \Delta E$

Berechnung der Pyruvatkonzentration

Aus $E_1 - E_2 = \Delta E$ und 0,905 als konstantem Faktor wird nach $c = 0{,}905 \times \Delta E$ (mMol/l) die Pyruvatkonzentration berechnet.

Normalwert: 0,041 - 0,067 mMol/l

2.3.2 Lactat

Es handelt sich um die Methode nach HOHORST in H.U. BERGMEYER.

Testprinzip:

L-Lactat wird durch NAD zu Pyruvat oxidiert, wobei die Lactatdehydrogenase als Katalysator dient:

(1) L-Lactat + NAD^+ $\overset{LDH}{\rightleftharpoons}$ Pyruvat + NADH + H^+

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der linken Seite. Um das Lactat quantitativ zu dehydrieren, müssen die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden: Die Protonen werden durch ein alkalisches Reaktionsmedium gebunden, Pyruvat wird als Hydrazon abgefangen:

(2) L-Lactat + NAD^+ + Hydrazin $\xrightarrow[pH=9,5]{LDH}$ Pyruvat-Hydrazon + NADH + H_3O^+

Die NADH- Bildung ist Meßgröße und wird an der Extinktionszunahme bei 366 nm gemessen.

Herstellung der Lösungen

1 Puffer/Hydrazin: Glycinpuffer 0,5 Mol/l; pH 9,0
Hydrazin 0,4 Mol/l
Inhalt mit dest. Wasser auf 75 ml verdünnen

2 NAD 27 mMol/l
Inhalt mit 7 ml dest. Wasser lösen

3 LDH $\geqq$ 650 U/ml
Inhalt unverdünnt verwenden

Probenvorbereitung

Enteiweißung:

Perchlorsäure (eiskalt; ca. 0,6 N) 2,0 ml
Blut 1,0 ml
Gut mischen, zweimal 10 min. bei ca. 5 000 U/min. zentrifugieren, Oberstand abgießen

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: Hg 366 nm
Glasküvette: 1 cm Schichtdicke
Inkubationstemperatur: 25°C
Messung gegen Luft (Extinktionszunahme)

In Reagenzgläser pipettieren:

	Leerwert	Probe
Lösung 1	2,00 ml	2,00 ml
Oberstand	-	0,20 ml
Perchlorsäure (ca. 0,6 N)	0,20 ml	-
Lösung 2	0,20 ml	0,20 ml
Suspension 3	0,02 ml	0,02 ml

Mischen, genau eine Stunde bei 25°C im Wasserbad inkubieren, in Küvetten gießen, Extinktion der Probe (E_p) und Extinktion des Leerwerts (E_L) gegen Luft messen. $E_p - E_L = \Delta E$

Berechnung der Lactatkonzentration

Mit 10,1 als konstantem Faktor und ΔE wird nach $c = 10{,}1 \times \Delta E$ (mMol/l) die Lactatkonzentration berechnet.
Normalwert: 1,0 - 1,78 mMol/l

2.3.3 ATP

Es wurde die Methode nach BÖCHNER in H.U. BERGMEYER angewandt.

Testprinzip:

In der von 3-Phosphorglyceratkinase katalysierten Reaktion phosphoryliert ATP Glycerat zu 1,3-Diphosphoglycerat:

(1) 3-Phosphoglycerat + ATP $\xrightarrow{PGK}$ 1,3-Diphosphoglycerat + ADP

Durch NADH wird das gebildete 1,3-DPG in der von Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase katalysierten Reaktion reduktiv gespalten zu Glycerinaldehyd-3-phosphat:

(2) 1,3-DGP + NADH + H^+ $\xrightarrow{GAPDH}$ GA-3-P + P + NAD^+

Glycerinaldehyd-3-phosphat wird jetzt durch das Enzym Triosephosphatisomerase in Dihydroxyacetonphosphat überführt:

(3) GA-3P $\xrightarrow{TIM}$ DAP

Anschließend wird Dihydroxyacetonphosphat unter der katalysierenden Wirkung der Glycerinphosphatdehydrogenase durch NADH zu Glycerin-1-phosphat reduziert:

(4) DAP + NADH + H^+ $\xrightarrow{GDH}$ Glycerin-1-P + NAD^+

Das Gleichgewicht der Reaktion (1) liegt auf der linken Seite. Durch 3-Phosphoglycerat-Überschuß und Abfangen des in Reaktion (1) gebildeten 1,3-Diphosphoglycerat in Reaktion (2), deren Gleichgewicht auf der rechten Seite liegt, kann ATP vollständig umgesetzt werden.

Die in der Indikatorreaktion (2) verbrauchte NADH-Menge ist der Menge an 1,3-DPG und damit auch der ATP-Konzentration äquivalent.

Durch Umsetzen des in Reaktion (2) gebildeten Glycerinaldehyd-3-Phosphat über Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-1-Phosphat in Reaktion (3) und (4) erhält man die doppelte Umsatzrate des NADH. Dieses dient als Meßgröße. Seine Absorption ist bei 366 nm photometrisch zu bestimmen.

Herstellung der Lösungen

1 Puffer/Glycerat-3-P:

Triäthanolamin-Puffer	0,5 Mol/l; pH 7,6
$MgSO_4$	4 mMol/l
Glycerat-3-Phosphat	6 mMol/l

Inhalt mit 50 ml dest. Wasser lösen

2 NADH 2,5 mMol/l
Inhalt mit 5 ml dest. Wasser lösen

3

PGK	$\geq$ 450 U/ml
GAPDH	$\geq$ 560 U/ml
TIM	$\geq$1000 U/ml
GDH	$\geq$ 80 U/ml

Inhalt unverdünnt verwenden

Probenvorbereitung

Enteiweißung:

Perchlorsäure (eiskalt; ca. 0,6 N)	4,0 ml
Blut	1,0 ml

Gut mischen, 10 min. bei 20 - 25°C stehen lassen und dann zweimal 10 min. bei ca. 5000 U/min. zentrifugieren, Oberstand sofort vom Niederschlag abgießen.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: Hg 366 nm
Küvette: 1 cm Schichtdicke
Inkubationstemperatur: 20 - 25°C
Messung gegen Luft (Extinktionsabnahme)

In eine Küvette pipettieren:

Lösung 1	2,00 ml
Lösung 2	0,20 ml
Oberstand nach Enteiweißung	0,20 ml

mit Plastikspatel mischen, Extinktion E_1 messen

Suspension 3	0,02 ml

Einmischen, Stillstand der Reaktion abwarten, Extinktion E_2 messen. $E_1 - E_2 = \Delta E$

Berechnung der ATP-Konzentration

Aus ΔE und dem konstanten Faktor 8,627 wird die ATP-Konzentration nach $c = 8{,}627 \times \Delta E$ (mMol/l) berechnet.

Normalwert: 0,375 - 0,631 mMol/l

2.3.4 pH-Wert (54,55)

Der pH-Wert wurde im Plasma, das wie oben beschrieben gewonnen wurde, bestimmt.
Gemessen wurde mit dem pH-Meter DIGITALMETER DIGI 610 der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten Weilheim.

Methode: Potentiometrische Messung mit der Glas-Elektrode

Prinzip:

An den äußeren Schichten der Glasmembran entstehen Potentialdifferenzen, deren Größe abhängig ist vom pH-Unterschied zwischen der Meßlösung und der in der Elektrode enthaltenen Pufferlösung.

Meßgröße ist das Potential der Glaselektrode im Verhältnis zu einem konstanten Bezugspotential.

Die pH-Elektrode wurde mit zwei Pufferlösungen von bestimmter H^+-Konzentration geeicht.

Normalwert im Nativblut: 7,35 - 7,45

2.3.5 Osmolarität

Die Osmolarität gibt die Zahl der osmotisch aktiven Teilchen in einer Lösung an.

Sie wurde ebenfalls im Plasma bestimmt. Gemessen wurde mit einem Halbmikro-Osmometer der Firma KNAUER, Berlin.

Prinzip:

Durch die gelösten Bestandteile wird der Gefrierpunkt einer wässrigen Lösung gegenüber dem Gefrierpunkt des reinen Wassers erniedrigt. Diese Gefrierpunktserniedrigung ist direkt proportional der Zahl der gelösten Teilchen (10).

Ansatz:

150 µl des zu untersuchenden Plasmas wurden in eine Küvette pipettiert und der Anschlag am Osmometer nach Gefrierung direkt abgelesen.

Normalwert: 330 - 350 mosm/l (7)

2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG (32,59)

Aus den erhaltenen Meßwerten wurden das arithmetische Mittel $\bar{x}$ und die Standardabweichung s berechnet.

Bei der statistischen Auswertung sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist der Unterschied der Ergebnisse in der gleichen Grundgesamtheit (d.h. jeweils gleiche Histidinkonzentration) lagerungszeitabhängig signifikant?

2. Sind die Ergebnisse der Versuchsserien abhängig von der Histidinkonzentration signifikant verschieden?

Hierzu wurde die Varianzanalyse von R.A.FISHER durchgeführt. Mit der doppelten Varianzanalyse, die hier am geeignetsten ist, da sie gleichzeitig zwei Variationsursachen untersuchen kann, wird die zufällige Streuung von der Streuung, die durch die verschiedenen Voraussetzungen (hier: Unterschiedliche Lagerungsdauer und verschiedene Stabilisierungsmittel) bedingt ist, getrennt.

Bei der Varianzanalyse werden nicht Einzelpunkte, sondern der ganze Kurvenverlauf berücksichtigt. Aus diesem Grund mußten wir diejenigen Proben eliminieren, die nicht durchgehend hatten untersucht werden können.

Zur genaueren Analyse der Zeit wurde der Scheffé-Test durchgeführt: Er zeigt, ob bei gleicher Histidinkonzentration die Konzentration des bestimmten Parameters zwischen zwei Zeitpunkten signifikant verschieden ist.

Als Nullhypothese wurde angenommen, daß kein zeit- und konzentrationsabhängiger Unterschied besteht.

Das Signifikanzniveau wurde auf 5% entsprechend $p < 0,05$ festgelegt.

Sind die Kurven signifikant verschieden, verlaufen also nicht parallel, so bedeutet dies, daß noch andere Faktoren als Zeit und Histidinkonzentration eine Rolle spielen. Diese sind wenig faßbar.

Vor allem auf interindividuelle Unterschiede ist jedoch hinzuweisen. So sind Pyruvat-, Lactat- und ATP-Konzentration und Osmolarität stark abhängig von der Person ($p < 0,05$), nur der pH- Wert ist personenunabhängig.

3 ERGEBNISSE

3.1 PYRUVAT

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen

Konzentration in mMol/l

	St.I; n=24		St.II; n=24		St.III; n=6	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1.Tag	0,11	0,02	0,03	0,02	0,01	0,004
3.Tag	0,15	0,03	0,03	0,02	0,04	0,007
7.Tag	0,26	0,05	0,04	0,03	0,04	0,01
21.Tag	0,18	0,04	0,54	0,14	0,64	0,01

Graphische Darstellung

Der Pyruvatspiegel bei Stabilisierungsmittel I ist schon am ersten Tag doppelt so hoch wie der für Nativblut geltende Normalwert, steigt bis zum 7. Tag auf das knapp 2 1/2-fache des Ausgangswertes von 0,11 mMol/l an und fällt bis zum 21. Tag dann wieder auf 0,18 mMol/l ab.

Unter Histidinzugabe dagegen - bei Stabilisierungsmittel II und III - liegt die Pyruvatkonzentration mit 0,03 mMol/l bzw. 0,01 mMol/l sogar unter dem Normalwert. Sie bleibt in beiden Fällen bis zum 7. Tag konstant und steigt dann erst bis zum 21. Tag rapid auf das ca. 20-fache des Ausgangswertes an.

Die Varianzanalyse zeigt, daß die drei Kurven nicht parallel (p= 0,0) verlaufen. Ihre Lage allerdings ist nicht signifikant (p=18,235) verschieden, d.h. die Abhängigkeit von der Histidinkonzentration ist gering. Die Abhängigkeit von der Zeit ist signifikant mit p=0,0.

Scheffé-Test: Bei Stabilisierungsmittel I ist die Zunahme bzw. Abnahme der Pyruvatkonzentration zu allen Zeitpunkten signifikant; bei Stabilisierungsmittel II ist erst ab dem 7. Tag ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, bei Stabilisierungsmittel III zeigt sich ab dem 7. Tag und auch schon zwischen dem 1. und 3. Tag ein signifikanter Anstieg.

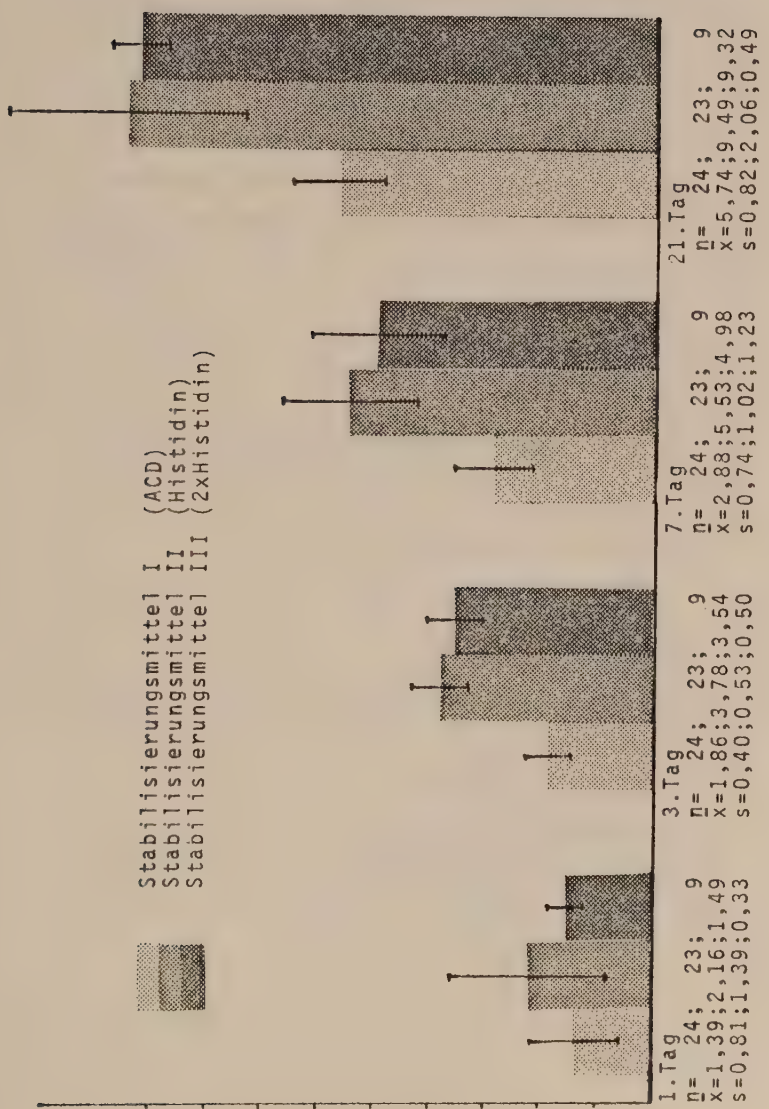
3.2 LACTAT

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen

Konzentration in mMol/l

	St.I; n=24		St.II; n=23		St.III; n=9	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1.Tag	1,39	0,81	2,16	1,39	1,49	0,33
3.Tag	1,86	0,40	3,78	0,53	3,54	0,50
7.Tag	2,88	0,74	5,53	1,02	4,98	1,23
21.Tag	5,74	0,82	9,49	2,06	9,32	0,49

Graphische Darstellung



Im mit Stabilisierungsmittel I versetzten Blut liegt der Mittelwert der Lactatkonzentration mit 1,39 mMol/l am 1. Tag im für Nativblut geltenden Normbereich und auch am 3. Tag mit 1,86 mMol/l nur geringfügig darüber. Ober 2,88 mMol/l am 7. Tag steigt er auf 5,74 mMol/l am 21. Tag und liegt damit weit über dem Normbereich.

In Stabilisierungsmittel II liegt das Lactat mit 2,16 mMol/l schon am 1. Tag über dem Normbereich und steigt bis zum 21. Tag auf 9,49 mMol/l kontinuierlich an.

Nimmt man die doppelte Histidinkonzentration, also Stabilisierungsmittel III, so liegt die Lactatkonzentration des 1. Tages zwar noch im Normbereich, doch an den übrigen Tagen steigt sie ebenfalls stark an, wobei aber alle Werte unter denen bei einfacher Histidinkonzentration (Stabilisierungsmittel II) liegen.

Die varianzanalytische Prüfung ergibt, daß zwischen den drei Kurven eine Wechselwirkung besteht, d.h. sie sind mit $p = 0{,}0$ nicht parallel. Die Abhängigkeit des Kurvenverlaufs vom Stabilisierungsmittel ($p = 0{,}0$) und von der Zeit ($p = 0{,}0$) ist signifikant.

Aus dem Scheffé-Test geht hervor, daß bei allen drei Kurven jeweils zwischen zwei Zeitpunkten immer eine signifikante Zunahme der Lactatkonzentration besteht.

$\frac{\text{Lactat}}{\text{Pyruvat}}$ - Quotient

Er gibt das Konzentrationsverhältnis dieser beiden Parameter wieder.

	St. I	St. II	St. III
1.Tag	12,64	77,14	124,17
3.Tag	12,65	114,55	93,16
7.Tag	11,12	149,46	138,33
21.Tag	31,71	17,48	14,59

In Stabilisierungsmittel I bleibt der $\frac{\text{Lactat}}{\text{Pyruvat}}$ - Quotient bis zum 7. Tag mit ungefähr 12 konstant und liegt damit etwas über dem üblichen Wert von 10. Am 21. Tag liegt das Verhältnis Lactat: Pyruvat bei etwa 32, d.h. es ist auf das fast 3-fache angestiegen.

Unter Histidinzusatz (Stabilisierungsmittel II und III), und zwar sowohl bei der einfachen wie auch der doppelten Konzentration, ist der Quotient während der ersten 7 Tage meist größer als 100. Zum 21. Tag zeigt er einen Abfall auf ein Fünftel bis fast ein Zehntel seiner früheren Werte.

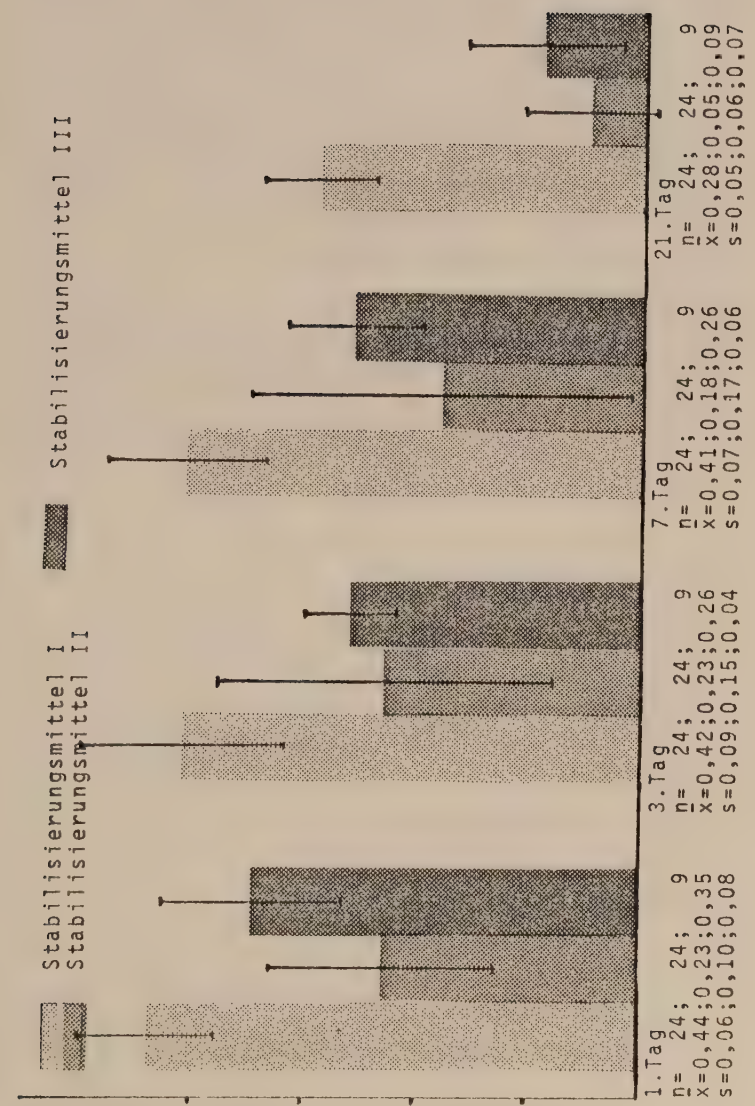
3.3 ATP

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen

Konzentration in mMol/l

	St.I; n=24		St.II; n=24		St.III; n=9	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1.Tag	0,44	0,06	0,23	0,10	0,35	0,08
3.Tag	0,42	0,09	0,23	0,15	0,26	0,04
7.Tag	0,41	0,07	0,18	0,17	0,26	0,06
21.Tag	0,28	0,05	0,05	0,06	0,09	0,07

Graphische Darstellung



Unter Stabilisierungsmittel I bleibt die ATP-Konzentration mit einem Wert, der etwas über 0,41 mMol/l und demnach im Normbereich liegt, konstant bis zum 7. Tag. Dann fällt sie bis zum 21. Tag auf 0,28 mMol/l ab.

In Stabilisierungsmittel II bleibt die ATP-Konzentration ebenfalls konstant bis zum 7. Tag, liegt aber mit einem Ausgangswert von 0,23 mMol/l am 1. Tag schon deutlich unter dem Normalwert. Bis zum 21. Tag fällt die Konzentration auf ein Fünftel des Ausgangswertes ab.

Bei Stabilisierungsmittel III liegt der ATP-Wert mit 0,35 mMol/l am 1. Tag knapp unter der unteren Normgrenze, fällt bis zum 3. Tag auf 0,26 mMol/l, bleibt bis zum 7. Tag konstant und fällt dann nochmals ab auf 0,09 mMol/l.

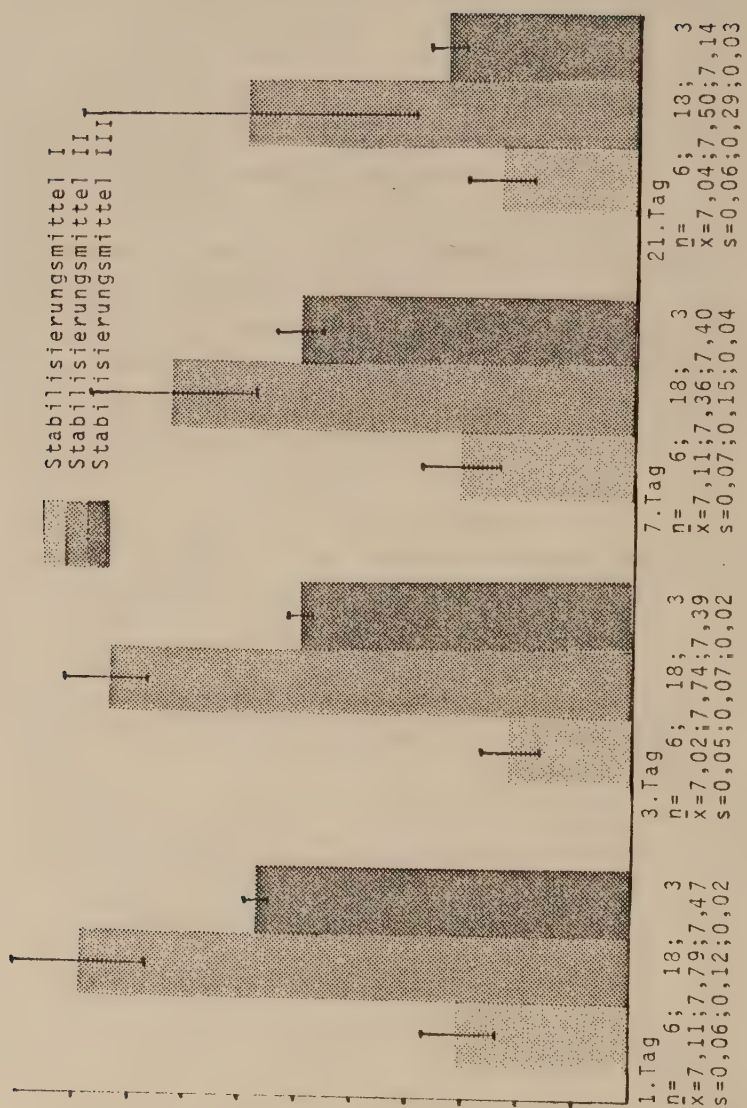
Die varianzanalytische Untersuchung, ob eine Wechselwirkung zwischen Konzentration und Zeit besteht, ergibt, daß die drei Kurven nicht signifikant verschieden sind, also parallel verlaufen ($p = 48{,}18$). Demnach lassen sich die drei Gruppen vereinigen und auf eine Kurve reduzieren. Diese zeigt einen signifikanten ATP-Abfall zwischen dem 1. und 7. Tag und zwischen dem 7. und 21. Tag. Die Abhängigkeit vom Stabilisierungsmittel ($p = 0{,}0$) und von der Zeit ($p = 0{,}0$) ist signifikant.

3.4 pH-WERT

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen

	St.I; n=6		St.II; n=18		St.III; n=3	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1.Tag	7,11	0,06	7,79	0,12	7,47	0,02
3.Tag	7,02	0,05	7,74	0,07	7,39	0,02
7.Tag	7,11	0,07	7,63	0,15	7,40	0,04
21.Tag	7,04	0,06	7,50	0,29	7,14	0,03

Graphische Darstellung



In Stabilisierungsmittel I liegt der pH-Wert mit 7,11 vom 1. Tag an auf der sauren Seite und ändert sich bis zum 21. Tag auch kaum.

In Stabilisierungsmittel II bleibt der pH-Wert mit einem Ausgangswert von 7,79 am ersten Tag und einem kontinuierlichen Abfall auf 7,50 am 21. Tag deutlich alkalisch, während er in Stabilisierungsmittel III mehr im physiologischen Bereich liegt: Von 7,47 am 1. Tag nimmt er auf 7,14 am 21. Tag ab.

Varianzanalytisch konnten nur die Werte der Stabilisierungsmittel I und II untersucht werden, da in Stabilisierungsmittel III nur drei Werte existierten.

Die Kurven von Stabilisierungsmittel I und II sind nicht signifikant verschieden ($p= 5,35$), d.h. sie verlaufen parallel. Der pH-Wert ist signifikant abhängig von der Art des Stabilisierungsmittels ($p=0,0$) und von der Zeit ($p= 0,06$).

Der Scheffé-Test konnte aus dem oben genannten Grund ebenfalls nur für Stabilisierungsmittel I und II durchgeführt werden. Er zeigt, daß in Stabilisierungsmittel I zwischen 1. und 3. Tag ein signifikanter Abfall,zwischen 3. und 7. Tag ein signifikanter Anstieg und zwischen 7. und 21. Tag wieder ein signifikanter Abfall besteht. In Stabilisierungsmittel II ist nur der pH-Abfall zwischen 1. und 21. Tag und 3. und 21. Tag signifikant.

Der graphischen Darstellung nach bleibt der pH-Wert bei Stabilisierungsmittel III bis zum 7. Tag konstant und fällt erst bis zum 21. Tag hin erheblich ab.

3.5 OSMOLARITÄT

Die Osmolarität wurde nur in Stabilisierungsmittel II bestimmt.

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen

Angabe in mosm/l

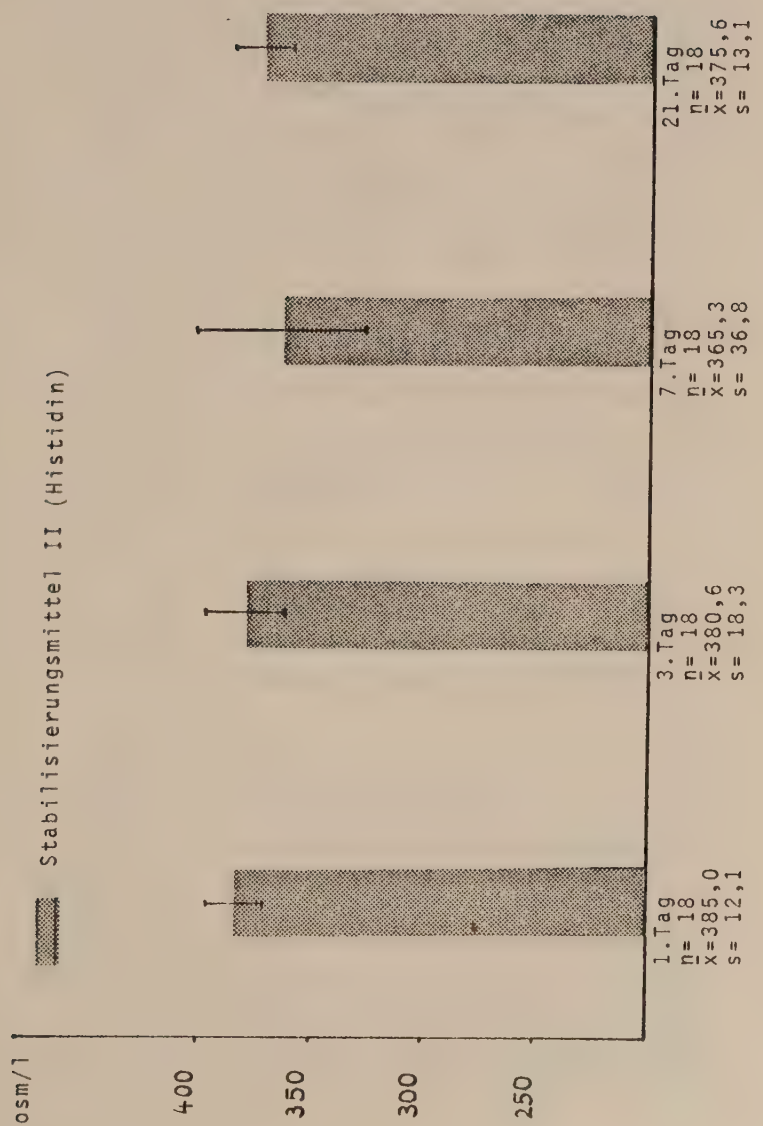
	St.II; n=18	
	$\bar{x}$	s
1.Tag	385	12,13
3.Tag	380,6	18,30
7.Tag	365,3	36,76
21.Tag	375,6	13,05

Am 1. Tag ist das Serum mit 385 mosm/l deutlich hyperosmolar, es erfolgt dann eine Osmolaritätsabnahme auf 365 mosm/l am 7. Tag und wieder ein leichter Anstieg auf 376 mosm/l am 21. Tag.

Da keine Vergleichswerte vorhanden waren, wurde hier nur die einfache Varianzanalyse durchgeführt. Sie ergibt mit p= 0,28 eine signifikante Abhängigkeit von der Zeit.

Der Scheffé-Test zeigt eine signifikante Abnahme der Osmolarität nur zwischen dem 3. und 7. Tag.

Graphische Darstellung



4 DISKUSSION

4.1 DISKUSSION DER METHODE

Da die Erythrocyten in quantitativer Hinsicht unter den Blutzellen die dominierende Rolle spielen (7), ist ihr Stoffwechsel, der auf einen nahezu reinen Glycolysestoffwechsel reduziert ist (7), bestimmend für die Metabolitenkonzentration im konservierten Blut. Zudem sind Leukocyten in ACD nur schlecht stabilisierbar; nach 48 Stunden sind ca. 50% der segmentkörnigen Granulocyten zerstört (2), am 2. und 3. Tag existieren nur noch wenige Granulocyten (28,36). Lymphocyten zeigen erst nach dem 20. Tag Quellformen (28,36), von den Thrombocyten sind nach dem 7. Tag noch 77%, nach dem 21. Tag noch 45% nachweisbar. Diese Zellen besitzen zwar einen vollständigen Citronensäurecyclus mit angeschlossener Atmungskette, in denen wesentlich mehr ATP gewonnen wird als in der Glycolyse der Erythrocyten. Trotzdem dürfte der dadurch entstehende Fehler infolge der geringen Zahl dieser Zellen und infolge des geringen O_2-Durchflusses in gelagerten Blutkonserven minimal sein (6).

Um exakte Aussagen über den Kohlenhydratstoffwechsel machen zu können, müßte man viele Einzelergebnisse im Stoffwechsel unterschiedlicher Zellen beurteilen (31). Da wir jedoch nur allgemein histidinspezifische Wirkungen auf Stoffwechselparameter des Konservenblutes feststellen wollten, beschränkten wir uns auf die Bestimmung von Vollblutparametern, die zwar keine zellspezifischen Aussagen machen, aber eine grobe Orientierung geben können.

Folgende Parameter wählten wir aus: Die Glucose als Ausgangssubstrat der energieliefernden Prozesse, Pyruvat und Lactat als Endprodukte der anaeroben Glycolyse, ATP als Maß für die gewonnene bzw. verbrauchte Energie, die Aldolase, die die Reaktion Fructose-1,6-diphosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. Dihydroxyacetonphosphat katalysiert, als Beispiel für ein Enzym des EMBDEN-MEYERHOF-Wegs, und die Elektrolyte Mg und Zn, weil Mg Cofaktor in vielen Enzymen ist und fast alles intrazelluläre ATP an einen Mg-Komplex gebunden ist und weil Zn in etlichen Enzymen, z.B. der LDH (52), enthalten ist und außerdem die Wundheilung fördert, was bei der Blutübertragung an Schwerverletzte wichtig sein kann.

Die Festlegung der Bestimmungstage erfolgte entsprechend den Versuchen von KLÄGER (31) und SCHAIBLE (61); wir untersuchten die obengenannten Parameter während der ersten Lagerungswoche dreimal: Am 1., 3. und 7. Lagerungstag - aus der bisherigen Erfahrung heraus, daß die wichtigsten Stoffwechselveränderungen zu Beginn der Lagerung stattfinden-, dann nur noch einmal nach 21 Tagen Lagerung. Dies ist die längste zulässige Lagerungsdauer für reine ACD- Blutkonserven. Die Tatsache, daß bei den von uns gemachten Untersuchungen die Hauptveränderungen nicht in die erste Woche fielen, wirft etliche Fragen auf und fordert weitere Untersuchungen vor allem in der 2. und 3. Lagerungswoche.

Bei der statistischen Auswertung gingen wir auf die Personenabhängigkeit der Parameter nicht weiter ein, weil es auch bei großen Untersuchungen und in der Praxis des Blutspendewesens nicht möglich ist, interindividuelle Schwankungen zu berücksichtigen.

4.2 DISKUSSION DER EINZELERGEBNISSE

Da Histidin mit dem Gedanken zugesetzt wurde, daß es die während der Lagerung entstehenden sauren Valenzen, die vor allem in den Untersuchungen von KLÄGER (31) und SCHAIBLE (61) mit Mg-Aspartat sehr stark zum Vorschein kamen, abpuffern könnte, soll an erster Stelle der pH-Wert diskutiert werden.

4.2.1 pH-Wert

In nur ACD-stabilisierten Konserven ist der pH-Wert vom 1. Tag an zur sauren Seite verschoben. Während der gesamten Lagerungsdauer ändert er sich um nur knapp eine Zehntel pH-Einheit.

Demgegenüber liegt er unter Histidinzusatz wesentlich mehr im basischen Bereich: Während der ersten Lagerungswoche unterscheidet er sich um 0,5 - 0,7 im Falle der einfachen Histidinkonzentration,um 0,3 - 0,4 pH-Einheiten im Falle der doppelten Histidinkonzentration vom pH bei ACD-Stabilisierung. Nach 3 Wochen Lagerung zeigt er in beiden Fällen einen signifikanten Abfall, bei doppelter Histidinkonzentration sogar in den sauren Bereich, während er bei einfacher Histidinkonzentration im Alkalischen bleibt. Von Interesse ist vor allem der Vergleich der pH-Werte bei den beiden Histidinkonzentrationen: Bei einfacher Histidinkonzentration liegt der pH durchweg 3 - 4 Zehntel pH- Einheiten höher als bei doppelter Histidinkonzentration. Dies ist nur bei gleichzeitiger Betrachtung der Lactatkonzentrationen zu erklären: Unter Zusatz der doppelten Histidinmenge liegt der Lactatspiegel wenigstens am 1. Tag im Normbereich,

unter Zusatz der einfachen Histidinmenge dagegen liegt er schon am 1. Tag deutlich darüber und steigt auch während der Lagerungszeit auf höhere Werte als unter doppeltem Histidinzusatz. Dies zeigt: Je saurer die Lösung durch Anhäufung saurer Endprodukte, desto stärker die Gegenregulation durch den pH. Einzuräumen ist allerdings, daß der Mittelwert des pH bei Stabilisierungsmittel III, also der doppelten Histidinkonzentration, aus nur drei Werten berechnet werden konnte, da der pH-Wert nur in nicht-hämolytischen Seren gemessen wurde. Ob diese Auswahl der Seren - also nur nicht-hämolytische - legitim ist, inwieweit also Hämolyse den pH verfälscht, ist die Frage. Vor allem wegen der geringen Probandenseren-Zahl sollte man aber dem pH-Wert bei Stabilisierungsmittel III eine nicht allzugroße Bedeutung beimessen.

Obwohl die Lactatwerte unter den Histidin-ACD-Stabilisatoren doppelt so hoch sind wie in der ACD-Lösung, fällt der pH-Wert - vor allem während der ersten Woche - nur geringgradig. Darin zeigt sich die gute Pufferwirkung des Histidin. Es ist durchaus imstande, Lactatkonzentrationen, die um das ca. 7 - 8-fache über der Norm liegen, wirksam abzupuffern. Histidin könnte also die Ergebnisse bei "Massivtransfusionen" (z.B. bei Herz-Lungen-Maschine), die durch eine metabolische Acidose oft negativ beeinflußt werden, verbessern (21).

4.2.2 Pyruvat und Lactat

Als Folge der Glycolyse reichern sich Pyruvat und Lactat als die Endprodukte im Konservenblut an.

Die Pyruvatkonzentration ist in ACD-stabilisierten Konserven schon am 1. Tag deutlich erhöht, steigt bis zum 7. Tag auf mehr als das Doppelte ihrer Aus-

gangskonzentration und zeigt am 21. Tag wieder eine signifikant niedrigere Konzentration. Nach den Untersuchungen von JUNGER (28) ist diese Pyruvatabnahme differenzierter zu sehen: Nach dem 8. Lagerungstag fällt die Pyruvatkonzentration ab, geht am 18. Tag aber nochmals in einen erneuten Anstieg über. KLÄGER (31) und JUNGER (28) geben dafür folgende Deutung: Pyruvat wird in den Tricarbonsäurecyclus der weißen Blutzellen und Thrombocyten eingeschleust - die roten Blutzellen haben keinen vollständigen Citronensäurecyclus mehr (31,49) - und verstoffwechselt (7, 34,52).

Da die Leukocyten und Thrombocyten in ACD rasch zerstört werden (2,28,36), die Lagerung bei $4^{o}C$ nach MURPHY geradezu einen "toxischen" Effekt auf die Thrombocyten hat, der Tricarbonsäurecyclus also während der Lagerung bei $4^{o}C$ schnell inaktiviert wird (31), nimmt die Pyruvatkonzentration zu. Der Abfall des Pyruvatgehaltes nach dem 8. Tag läßt aber - nach JUNGER (28) - darauf schließen, daß es einer weiteren Verstoffwechselung unterliegt, die gegen Ende der Lagerungszeit gestört wird: Es kommt wieder zur Pyruvatkonzentrationszunahme. Der "Pyruvatstau" während der zweiten Lagerungshälfte ist, wie JUNGER deutet, durch Rückwirkung eines Citratstaues, das infolge einer Störung im Citratcyclus nicht mehr abgebaut werden kann, bedingt. Diese Änderung wirkt auf das Pyruvat zurück, das als Schlüsselsubstanz der Kohlenhydrate zum Citratcyclus angesehen werden muß (28).

Unter Histidinzugabe bleibt die Pyruvatkonzentration während der ersten Lagerungswoche konstant, etwas unter dem Normbereich; sie ist nur

wenig von der Histidinkonzentration abhängig.

Das Lactat nimmt in allen drei Stabilisatormedien kontinuierlich und signifikant zu. Für ACD-stabilisierte Konserven wird dies auch von JUNGER (28) und HURN (24) so beschrieben. Nur am 1. Tag liegt der Lactatspiegel in der ACD-stabilisierten Konserve und bei Zusatz der doppelten Histidinmenge noch im Normbereich. Dann steigt er stark an, wobei er unter Histidinzugabe am 7. Tag schon fast den Lactatspiegel der ACD-Konserve vom 21. Tag erreicht. Bis zum 21. Tag schreitet die Lactatbildung vor allem in den Konserven mit Histidinzusatz so stark fort, daß sie Werte von über 9,30 mMol/l gegenüber 5,74 mMol/l in ACD erreicht. Zu dieser starken Lactatbildung in den Histidin-ACD-Konserven kommt es aus folgendem Grund: Histidin mit seiner Pufferwirkung sorgt dafür, daß der pH deutlich höher als neutral ist; dadurch wird die Hexokinase, die Glucose zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, aktiviert; es kommt zu einer Beschleunigung der Glycolyse (18,43) und damit zu einer vermehrten Bildung von Lactat (31,74). In reinen ACD-Konserven verlangsamt die Acidität die Glycolyse, weiterhin wird sie in dem Maß verlangsamt, wie Milchsäure sich während der Lagerung anhäuft (18). Unter der Wirkung von Histidin dagegen bleibt der pH alkalisch - nur bei doppelter Histidinzugabe sinkt er nach 21 Tagen auf saure Werte ab -, die Glycolyserate bleibt hoch und damit auch die Lactatbildung.

Zudem trägt auch das im K-Mg-Aspartat zugeführte Mg zu einer Aktivierung der Glycolyseenzyme bei.

Wie auch die Versuche von RAPOPORT und ABABEI (53) zeigten, ist die Pyruvatbildung gering, solange

der pH hoch ist: Während die Lactatbildung mit steigendem pH zunimmt, nimmt die Pyruvatbildung ab. Der Lactat/Pyruvat-Quotient wird größer. RAPOPORT und ABABEI weisen darauf hin, daß die beobachtete Pyruvatbildung und der Lactat/Pyruvat-Quotient im Widerspruch zu den theoretischen Erwartungen stehen, wonach bei steigendem pH (=Abnahme der H^+) die Pyruvatkonzentration zunehmen, der Quotient abnehmen müßte:

$$\text{Lactat} + \text{NAD} \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+$$

Die Lactatdehydrogenase steht in intakten Erythrocyten also nicht im Gleichgewicht; die Abweichungen entstehen z.B teilweise durch die Wirkung von $NADH_2$- bzw. $NADPH_2$- oxidierenden Systemen (53).

KLÄGER (31) beschreibt vier mögliche Ursachen eines größeren Lactat/Pyruvat-Quotienten:

1. weniger Pyruvat
2. verändertes NAD/NADH- Verhältnis
3. Pyruvat wird vermehrt über den Tricarbonsäurecyclus verstoffwechselt
4. Pyruvat wird vermehrt zu Lactat reduziert.

Zu 1.: Bei steigendem pH nimmt das Pyruvat ab, der Lactat/Pyruvat-Quotient nimmt zu (s.o.).

Zu 2.: Zwischen Lactat/Pyruvat und NADH/NAD besteht ein enges Verhältnis. Je nachdem, in welcher Menge NADH bei der Oxydation von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat gewonnen wird und wieviel für die Reduktion von Met-Hb verbraucht wird, entscheidet es sich, wieviel NADH für die Lactatdehydrogenasereaktion bleibt (vgl.Reaktionsgleichung oben).

Zu 3.: s.o.

Zu 4.: Deshalb nicht, weil die Lactatkonzentration in Histidin-ACD an allen Tagen signifikant größer ist als in ACD.

Beim Vergleich der Lactat/Pyruvat-Quotienten in ACD mit denen in Histidin-ACD zeigen sich nämlich markante Unterschiede: Während der ersten sieben Tage bleibt - wenigstens der Größenordnung nach - der Quotient jeweils etwa gleich: In ACD etwa um 12, bei Histidinzusatz fast immer > 100. Am 21. Tag ist er in ACD auf das fast Dreifache angestiegen, bei Histidinzusatz auf weniger als ein Fünftel des Ausgangswertes abgefallen. Daß er in ACD nur wenig über dem Normalwert von 10 liegt, ist auf die gleichsinnige Erhöhung von Lactat und Pyruvat zurückzuführen; Lactat- und Pyruvatveränderungen entsprechen einander eng (23). Der Anstieg am 21. Tag spiegelt vor allem die hohe Lactatkonzentration wider. Die hohen Quotienten bei Histidinzusatz rühren von der stark erhöhten Lactatkonzentration verbunden mit der geringen Pyruvatkonzentration her. Der sprunghafte Pyruvatanstieg am 21. Tag auf das ca. 20-fache des Ausgangswertes und damit auf das über 3-fache der Pyruvatkonzentration in ACD ist auch durch die hohe Lactatkonzentration nicht mehr aufzufangen; der Quotient fällt stark ab. Die starke Pyruvatzunahme in Histidin am 21. Tag ist allein durch den pH-Abfall nicht erklärbar. Es muß - nach JUNGER (28) - zu einem massiven Citratstau gekommen sein, so daß das als Schlüsselsubstanz der Kohlenhydrate zum Citratcyclus fungierende Pyruvat stark rückgestaut wird. Es wäre auch möglich, daß die Konserve stark hypoxämisch geworden ist, die Pyruvatdehydrogenase deshalb in inaktiver Form vorliegt (7), und es dadurch zu der starken Pyruvatanhäufung kommt.

Anhand unserer Ergebnisse zeigt sich deutlich die von RAPOPORT und ABABEI beschriebene starke pH-Abhängigkeit des Lactat/Pyruvat-Quotienten (53).

4.2.3 ATP

Die bestbekannte und wichtigste biochemische Veränderung während der Lagerung ist der rapide Abfall von 2,3- DPG und der Abfall von ATP; beide Parameter sind eng aneinander gekoppelt (69). Solange eine Reserve an 2,3- DPG vorhanden ist, das ADP zu ATP rephosphorylieren kann, kann der ATP-Spiegel konstant gehalten werden. Ist diese Quelle energiereicher Phosphate, die zusammen mit einer kleinen Menge ATP die einzige verfügbare Metabolitquelle des Erythrocyten ist(24), aufgebraucht, so fällt auch das ATP schneller (1).

In ACD bleibt die ATP-Konzentration während der ersten 7 Tage konstant und im Normbereich. Bis zum 21. Tag fällt sie dann signifikant unter die untere Normgrenze ab. Bei Zusatz der einfachen Histidinkonzentration bleibt die ATP-Konzentration ebenfalls konstant während der ersten Woche und fällt bis zum 21. Tag signifikant ab. Doch liegt die Konzentration am 1. Tag schon weit unter der unteren Normgrenze, am 21. Tag liegt sie bei etwa einem Sechstel der ATP-Konzentration in ACD oder bei ca. einem Zehntel des Normalwertes im Vollblut. Bei der doppelten Histidinkonzentration liegt der ATP-Wert am 1. Tag zwar nur wenig unter der unteren Normgrenze, fällt aber schon zum dritten Tag signifikant ab auf Werte, die nur wenig über denen bei einfacher Histidinkonzentration liegen. Am 21. Tag ist nochmals eine signifikant niedrigere ATP-Konzentration zu verzeichnen. Es stellt sich die Frage, wodurch die wesentlich

niedrigere ATP-Konzentration bei Histidinzusatz hervorgerufen sein könnte. Histidin bewirkt einen höheren pH, dadurch wird die Glycolyse aktiviert (s.4.2.2; 43). Dies ist - nach GREENWALT undPERRY (18) - wünschenswert, da für jedes Mol Glucose, das im EMBDEN-MEYERHOF-Weg verbraucht wird, 2 Mol ATP entstehen. Ein erhöhter pH sollte also die Erhaltung des ATP begünstigen (48). Erst ein pH von über 7,8 sollte sich negativ auf die ATP-Konzentration auswirken (26). Ein anfangs niedrigerer ATP-Spiegel wäre dadurch zu erklären, daß im oberen Teil der Glycolyse erst einmal ATP verbraucht wird, bevor es unten gewonnen werden kann. Doch müßte sich das dann vermehrt entstehende ATP auch in einer Erhöhung der ATP-Konzentration zu einem späteren Zeitpunkt widerspiegeln. Die erhöhte Lactatkonzentration dürfte - wenigstens bis zum 7. Tag - keine große Rolle in Bezug auf Suppression der Glycolyse spielen,da der pH-Wert ja nur geringfügig abfällt.

Da der Grund für den niedrigen ATP-Spiegel in Histidin-ACD also nur schwerlich in einer verminderten Bereitstellung von ATP auszumachen ist, ja eigentlich alles dagegenspricht, muß an einen erhöhten Verbrauch von ATP gedacht werden: ATP wird verbraucht bei Prozessen, die Zellintegrität und Zellform aufrechterhalten (2,35,44,50,52,61,71): Es ist Brennstoff für die Na- und K- abhängige ATPase, es spielt eine wichtige Rolle fürs Kationengleichgewicht, für das Wassergleichgewicht und für die Gestalt der Erythrocyten (18). Während der ersten 7 Tage dürfte die ATP-Konzentration noch ausreichend sein, um diese Aufgaben erfüllen zu können - die ATP-Konzentration bleibt konstant -, während dies am 21. Tag sicher nicht mehr der Fall ist: Alle von uns untersuchten Seren waren am 21.Tag

stark hämolytisch. Hämolyse wird nach RAPOPORT als "Schädigung der Zellmembran, die den Austritt des Hämoglobin aus den Erythrocyten zur Folge hat", definiert (61). Vor allem ATP- Abfall führt zur Hämolyse, auf der anderen Seite greift die Hämolyse ihrerseits in den Stoffwechsel ein, indem durch sie ATPasen und DPNasen aktiviert werden (40): ATP spaltende Enzyme werden bei Hämolyse aktiv (40,52,61).

4.2.4 Osmolarität

Da die Osmolarität nur in den Konserven mit Stabilisierungsmittel II, also denen mit einfacher Histidinkonzentration gemessen wurde, fehlen Vergleichswerte.

Das Plasma ist an allen Bestimmungstagen hyperosmolar; zwar fällt die Osmolarität bis zum 7. Tag ab, steigt aber bis zum 21. Tag wieder etwas an.

Diese Hyperosmolarität kann ebenfalls zur Hämolyse beitragen, auch wenn diese am 21. Tag erst makroskopisch sichtbar wird. Dies könnte wiederum negative Folgen für die ATP-Konzentration haben (s.4.2.3).

Wegen fehlender Vergleichswerte läßt sich nicht sagen, ob der Histidinzusatz diese Erhöhung der Osmolarität bedingt. Falls dies so wäre, müßten aus den oben genannten Gründen - vermehrte Hämolyse und daraus resultierende Verringerung der ATP-Konzentration-Bedenken gegen die Eignung des Histidin als Stabilisatorzusatz erhoben werden.

4.3 VERGLEICH DER STOFFWECHSELWIRKUNGEN UNTER Mg-ASPARTAT-ACD UND HISTIDIN- K- Mg- ASPARTAT- ACD

Will man feststellen, welche Veränderungen sich nun unter Zusatz von Histidin im Vergleich zu den Ergebnissen in Mg- Aspartat- ACD von KLÄGER (31) und SCHAIBLE (61) ergeben, so zeigt sich folgendes:

Unter Zusatz der einfachen Histidinkonzentration liegt der pH- Wert um 1,2 Einheiten, unter Zusatz der doppelten Histidinkonzentration um 0,9 Einheiten höher als im Mg- Aspartat- ACD. Dieser hohe pH müßte durch Aktivierung der Glycolyse theoretisch zu einer wesentlich stärkeren Lactatbildung führen als in Mg- Aspartat- ACD. Tatsächlich ist die Lactatkonzentration bei einfacher Histidinmenge aber gleich hoch wie in Mg- Aspartat- ACD.

Der Vergleich der Pyruvatspiegel bestätigt eher die oben schon beschriebenen Beobachtungen von RAPOPORT und ABABEI (53), wonach die Pyruvatbildung bei steigendem pH abnimmt: Die Pyruvatkonzentrationen sowohl bei einfacher als auch bei doppelter Histidinkonzentration waren wesentlich geringer als in Mg- Aspartat- ACD.

Nicht zu erklären ist dagegen, weshalb der ATP-Spiegel - mit Ausnahme des 1. Tages unter doppelter Histidinkonzentration - während der gesamten Lagerungsdauer weniger als halb so hoch liegt wie unter Mg- Aspartat.

Der höhere pH führt zu einer gesteigerten Glucoseutilisation; warum dies nicht mit einem Energiegewinn in Form von ATP verbunden ist, bleibt unklar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

An vier Bestimmungstagen innerhalb eines dreiwöchigen Zeitraums untersuchte ich anhand der Parameter pH, Pyruvat, Lactat, ATP und Osmolarität, wie sich ein Zusatz zweier verschiedener Konzentrationen von K- Mg- Aspartat- Histidin zum ACD- Stabilisator auf den Stoffwechsel von Blutkonserven auswirkt. Als Vergleichsbasis diente Blut, das in reiner ACD- Lösung konserviert worden war. Folgende Resultate ergaben sich:

1. pH- Wert

Bezüglich des pH- Werts erfüllt der Histidinzusatz voll die in ihn gesetzten Erwartungen: Im Gegensatz zur Konservierung in ACD bleibt der pH- Wert bei beiden untersuchten Histidinkonzentrationen während der ersten Woche konstant, fällt erst zum 21. Tag hin ab, liegt aber während der gesamten Lagerungsperiode deutlich über dem pH- Wert in reiner ACD- Lösung. Die unter anderen Stabilisierungsmitteln stark auftretende Säuerung wird verringert bzw. bleibt ganz aus.

2. Pyruvat

Während der ersten Lagerungswoche bewirkt die Histidinzugabe einen konstant niedrigen Pyruvatspiegel; er liegt wesentlich unter dem Pyruvatspiegel in ACD. Die Wechselwirkungen zum Lactatspiegel in Abhängigkeit vom pH- Wert wurden diskutiert. Zum 21. Tag hin nimmt die Pyruvatkonzentration unter Histidin in beiden Fällen rapid zu; eine Ursache hierfür wurde darin gesucht, daß möglicherweise andere, von uns nicht unter-

suchte Stoffwechselwege sekundär Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben.

Bezüglich der Anwendbarkeit des Histidin als Stabilisatorzusatz ergibt sich die gleiche Frage wie bei seiner Wirkung auf den Lactatspiegel; allerdings müßte der Zeitraum zwischen 7. und 21. Tag noch genauer untersucht werden, da die Pyruvatwerte während der ersten Woche ja durchaus positiv zu bewerten sind und der Zeitpunkt des Anstiegs nicht bekannt ist.

3. Lactat

Infolge einer durch den höheren pH bedingten Aktivierung der Glycolyse steigt die Lactatkonzentration unter Histidinzugabe um fast das Doppelte an. Histidin mit seiner Pufferwirkung sorgt zwar dafür, daß die erwartete starke pH- Erniedrigung nicht eintritt, es stellt sich jedoch die Frage, ob derart hohe Lactatkonzentrationen bei einer Transfusion nicht doch zu einer Lactacidose führen bzw. eine solche verschlimmern könnten - gerade bei "Massivtransfusionen", für die ja besonders nach einem geeigneten Stabilisatormedium gesucht wird.

4. ATP

Wider alle Erwartung liegt die ATP- Konzentration unter Histidinzusatz durchweg etwa um die Hälfte unter derjenigen in reiner ACD- Lösung, und bis zum 21. Tag fällt sie nochmals ganz massiv ab - trotz gesteigerter Glycolyse. Mögliche Ursachen wurden erörtert, ein eigentlicher Grund jedoch konnte nicht gefunden werden.

5. Osmolarität

Zwar ist unter Histidinzusatz das Plasma konstant hyperosmolar; Aussagen über histidinspezifische

Wirkungen auf die Osmolarität lassen sich aber wegen fehlender Vergleichswerte nicht machen.

Obwohl das unter dem Gedanken der Pufferwirkung in zwei verschiedenen Konzentrationen zugesetzte Histidin in diesem Punkt voll befriedigt, sind bei Betrachtung der übrigen Parameter doch Bedenken hinsichtlich der Konzentration angezeigt: Dies betrifft die starke Zunahme der Glycolyseendprodukte Pyruvat und Lactat, vor allem aber das ATP, dessen Konzentrationserhaltung im Hinblick auf die vielen Stoffwechselprozesse, an denen es beteiligt ist, geradezu als "Gütezeichen" für den Wert eines Stabilisators gilt. Der Nutzen einer Transfusion mit derart niedriger ATP- Konzentration ist erheblich in Frage gestellt, da mit fallender ATP- Konzentration vor allem die Oberlebensrate der roten Blutzellen im Empfängerorganismus drastisch zurückgeht.

Hiernach stellt der Zusatz von Histidin in der angegebenen Konzentration insgesamt keinen wesentlichen Fortschritt auf dem Weg zum "idealen Stabilisator" dar.

6 TABELLARISCHER ANHANG

6.1 STABILISIERUNGSMITTEL I (ACD-Stabilisator)

6.1.1 Pyruvat (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,077	0,098	0,204	0,192
2	0,109	0,102	0,238	0,214
3	0,107	0,135	0,344	0,177
4	0,091	0,104	0,240	0,217
5	0,138	0,136	0,226	0,192
6	0,154	0,171	0,231	0,157
7	0,118	0,176	0,247	0,149
8	0,140	0,186	0,347	0,199
9	0,133	0,192	0,380	0,188
10	0,093	0,145	0,235	0,144
11	0,085	0,150	0,238	0,172
12	0,097	0,161	0,208	0,101
13	0,062	0,126	0,190	0,241
14	0,091	0,188	0,335	0,184
15	0,102	0,165	0,308	0,167
16	0,103	0,147	0,222	0,143
17	0,117	0,154	0,213	0,119
18	0,098	0,167	0,246	0,163
19	0,107	0,125	0,281	0,197
20	0,097	0,145	0,231	0,222
21	0,112	0,161	0,249	0,152
22	0,132	0,163	0,348	0,281
23	0,151	0,126	0,227	0,217
24	0,121	0,109	0,224	0,161

6.1.2 Lactat (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,75	1,71	2,30	5,31
2	0,84	1,95	2,36	5,15
3	0,82	2,15	2,62	5,05
4	1,03	1,84	2,46	5,92
5	0,96	1,92	2,22	4,53
6	0,77	1,67	2,06	4,33
7	2,51	2,31	3,75	6,61
8	1,88	2,00	3,07	5,41
9	1,37	1,52	2,79	4,87
10	1,31	1,53	2,81	5,41
11	1,86	1,95	3,33	7,06
12	1,45	1,26	2,28	5,16
13	0,38	1,52	2,48	6,57
14	0,60	1,64	2,58	5,61
15	0,60	1,35	2,04	5,15
16	0,79	1,57	2,04	6,97
17	0,39	1,40	2,04	5,05
18	0,55	1,27	2,48	6,18
19	2,10	2,59	3,94	6,88
20	2,21	2,66	4,27	6,99
21	1,72	2,10	3,93	5,74
22	2,05	2,23	3,76	5,30
23	1,73	2,22	3,74	6,11
24	1,62	2,20	3,84	6,48

6.1.3 ATP (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,47	0,47	0,40	0,35
2	0,45	0,48	0,23	0,35
3	0,47	0,32	0,43	0,23
4	0,55	0,47	0,43	0,33
5	0,38	0,34	0,32	0,22
6	0,52	0,51	0,36	0,28
7	0,43	0,41	0,41	0,28
8	0,35	0,43	0,33	0,17
9	0,35	0,42	0,40	0,26
10	0,41	0,35	0,41	0,26
11	0,42	0,39	0,43	0,28
12	0,42	0,37	0,31	0,26
13	0,46	0,47	0,47	0,37
14	0,38	0,50	0,47	0,32
15	0,35	0,44	0,47	0,28
16	0,43	0,07	0,46	0,33
17	0,41	0,43	0,40	0,22
18	0,49	0,52	0,50	0,35
19	0,50	0,43	0,41	0,25
20	0,43	0,42	0,39	0,21
21	0,51	0,52	0,50	0,24
22	0,42	0,43	0,36	0,20
23	0,48	0,49	0,52	0,28
24	0,52	0,45	0,45	0,28

6.1.4 pH- Wert

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	-	8,13	-	6,81
2	-	8,10	-	6,81
3	-	8,27	-	6,83[X]
4	-	8,12	-	6,81
5	-	8,18	8,07	6,81
6	-	7,81	-	6,81
7	-	7,66	-	6,91
8	-	7,37	-	6,93
9	-	7,64	-	6,95
10	-	7,77	-	6,99
11	-	7,75	-	7,01
12	-	7,67	-	6,95
13	-	7,06	6,95	6,92
14	-	7,11[X]	6,97	6,98
15	-	7,00	6,88	6,92
16	-	7,07	6,97	7,02
17	-	6,93	6,86	6,86
18	-	6,93	6,94	6,96
19	7,16	7,03	7,09	7,06[X]
20	7,16	7,02	7,16	7,10[X]
21	7,05	7,02	7,15	7,04[X]
22	7,11	7,01	7,15	7,06[X]
23	7,01	6,92	6,99	6,93[X]
24	7,14	7,09	7,14	7,06[X]

[X]Plasma hämolytisch

6.2 STABILISIERUNGSMITTEL II (einfache Histidinkonzentration)

6.2.1 Pyruvat (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,000	0,049	0,047	0,608
2	0,000	0,030	0,011	0,593
3	0,000	0,043	0,020	0,569
4	0,052	0,040	0,028	0,605
5	0,026	0,051	0,052	0,541
6	0,063	0,039	0,071	0,623
7	0,049	0,031	0,019	0,572
8	0,045	0,037	0,044	0,481
9	0,047	0,063	0,047	0,662
10	0,035	0,051	0,036	0,681
11	0,076	0,046	0,041	0,671
12	0,042	0,045	0,041	0,461
13	0,010	0,019	0,024	0,595
14	0,016	0,028	0,033	0,606
15	0,011	0,029	0,016	0,575
16	0,011	0,049	0,025	0,587
17	0,009	0,019	0,034	0,000
18	0,014	0,016	0,016	0,577
19	0,043	0,031	0,161	0,573
20	0,028	0,023	0,062	0,534
21	0,022	0,052	0,008	0,346
22	0,031	0,000	0,018	0,544
23	0,022	0,000	0,008	0,538
24	0,022	0,000	0,028	0,513

6.2.2 Lactat (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	3,67	4,53	7,25	12,22
2	3,55	4,24	5,82	10,12
3	4,17	3,40	6,12	11,01
4	5,56	3,95	7,47	11,92
5	2,91	3,65	5,11	11,11
6	5,44	3,52	6,11	11,72
7	1,56	3,40	5,99	9,35
8	1,90	3,37	5,60	7,91
9	2,19	4,55	5,47	8,87
10	1,12	3,15	5,05	9,06
11	1,15	3,34	6,37	9,86
12	1,19	3,79	6,36	10,36
13	0,83	3,99	4,03	5,17
14	1,11	3,25	3,09	6,78
15	1,51	4,01	-	8,16
16	1,14	3,63	4,50	7,90
17	0,82	3,87	5,59	10,71
18	1,30	3,76	3,94	8,28
19	1,70	3,86	5,68	6,61
20	1,89	2,51	4,59	8,10
21	1,66	4,60	5,80	12,50
22	1,78	4,04	5,52	7,50
23	1,69	4,75	5,60	8,59
24	1,49	3,89	6,16	12,73

6.2.3 ATP (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,17	0,26	0,50	0,00
2	0,26	0,33	0,35	0,00
3	0,20	0,24	0,32	0,04
4	0,23	0,26	0,42	0,18
5	0,25	0,18	0,37	0,12
6	0,22	0,28	0,44	0,08
7	0,19	0,43	0,00	0,07
8	0,15	0,40	0,26	0,11
9	0,15	0,29	0,00	0,01
10	0,23	0,45	0,00	0,19
11	0,36	0,42	0,00	0,13
12	0,27	0,00	0,00	0,03
13	0,30	0,38	0,34	0,00
14	0,25	0,00	0,22	0,00
15	0,33	0,17	0,20	0,00
16	0,30	0,25	0,22	0,00
17	0,35	0,28	0,26	0,00
18	0,40	0,44	0,17	0,00
19	0,12	0,17	0,17	0,00
20	0,36	0,12	0,04	0,00
21	0,00	0,14	0,00	0,00
22	0,04	0,00	0,13	0,10
23	0,24	0,06	0,00	0,05
24	0,15	0,00	0,00	0,00

6.2.4 pH- Wert

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	-	-	8,05	7,37[X]
2	-	-	7,99	7,23[X]
3	-	-	8,04	7,36[X]
4	-	-	8,04	7,34[X]
5	-	-	7,93	7,25[X]
6	-	-	8,02	7,24[X]
7	7,75	7,76	7,42	7,70[X]
8	7,72	7,74	7,49	7,68[X]
9	7,74	7,71	7,48	7,68[X]
10	7,77	7,78	7,49	7,71[X]
11	7,76	7,64	7,44	7,54[X]
12	7,64	7,64	7,58	7,74[X]
13	7,68	7,70	7,59	7,70[X]
14	7,68	7,63	7,65	7,56[X]
15	7,72	7,69	7,63	7,09[X]
16	7,62	7,64	7,53	7,62[X]
17	8,02	7,78[X]	7,84[X]	7,36[X]
18	7,93	7,82	7,81[X]	7,49[X]
19	7,93	7,75[X]	7,87[X]	6,85[X]
20	7,90	7,78	7,75[X]	7,53[X]
21	7,90	7,86[X]	7,77[X]	7,42[X]
22	7,93	7,82	7,81[X]	6,85[X]
23	7,81	7,78	7,51	7,70[X]
24	7,73	7,73	7,67	7,74[X]

[X] Plasma hämolytisch

6.2.5 Osmolarität (mosm/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	-	-	400	395
2	-	-	385	385
3	-	-	390	395
4	-	-	400	395
5	-	-	390	390
6	-	-	385	385
7	395	395	380	365
8	390	390	395	385
9	400	400	385	380
10	400	390	375	380
11	395	390	385	380
12	400	400	380	375
13	390	395	385	365
14	380	365	395	380
15	385	400	390	395
16	380	390	380	390
17	380	385	390	395
18	385	395	390	360
19	400	380	400	395
20	360	355	320	355
21	375	360	320	365
22	370	350	300	365
23	370	355	300	360
24	375	355	305	370

6.3 STABILISIERUNGSMITTEL III (doppelte Histidinkonzentration)

6.3.1 Pyruvat (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,109	0,039	0,033	0,634
2	0,181	0,041	0,026	0,641
3	0,118	0,029	0,041	0,641
4	0,091	0,032	0,024	0,629
5	0,091	0,047	0,051	0,634
6	0,181	0,041	0,045	0,661
7	-	0,027	-	-
8	-	0,027	-	-
9	-	0,034	-	-
10	-	0,033	-	-

6.3.2 Lactat (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	1,15	2,77	3,89	8,25
2	2,20	3,73	4,88	9,69
3	1,27	3,43	4,50	9,69
4	1,28	3,33	4,36	9,55
5	1,38	3,18	4,04	8,92
6	1,25	3,19	3,90	9,50
7	1,77	4,19	6,26	9,79
8	1,67	4,30	5,45	9,39
9	1,47	3,78	5,63	9,14
10	1,26	3,72	5,45	-

6.3.3 ATP (mMol/l)

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	0,41	0,20	0,31	0,14
2	0,45	0,23	0,33	0,17
3	0,36	0,23	0,34	0,15
4	0,35	0,26	0,30	0,14
5	0,35	0,26	0,22	0,16
6	0,28	0,26	0,22	0,09
7	0,33	0,24	0,23	0,00
8	0,41	0,33	0,24	0,00
9	0,18	0,24	0,17	0,00
10	0,28	0,24	0,31	0,00

6.3.4 pH- Wert

n	1. Tag	3. Tag	7. Tag	21. Tag
1	7,67	-	-	7,23[X]
2	7,23	-	-	7,18[X]
3	6,66	-	-	7,17[X]
4	7,68	-	-	7,21[X]
5	7,69	-	-	7,14[X]
6	6,69	-	-	7,19[X]
7	7,47	7,38[X]	7,40[X]	7,12[X]
8	7,46	7,38[X]	7,37[X]	7,12[X]
9	7,49	7,41[X]	7,44[X]	7,17[X]
10	7,42	7,34[X]	7,33[X]	-

[X] Plasma hämolytisch

7 LITERATURVERZEICHNIS

1 BARTLETT, G. R. and SCHAFER, A. N.:
Phosphorylated carbohydrate intermediates of the human erythrocytes during storage in acid citrate dextrose
J. Clin. Invest. 40, 1178-1184 (1961)

2 BEGEMANN, H.:
Klinische Hämatologie
2. Aufl. Stuttgart: Thieme 1975

3 BERGMEYER, H. U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
3. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1974

4 BLUM, K. u. U.:
Stoffwechselveränderungen bei Lagerung von Blut
Bibl. Haemat. 12, 20-63 (1961)

5a BREWER, G. J.:
General red cell metabolism
in: SURGENOR, D.: The red blood cell, 387-426
2. Aufl. New York, London: Academic Press, INC, 1974/1

5b BREWER, G. J.:
Red cell metabolism and function,
in: SURGENOR, D.: The red blood cell, 474-504
2. Aufl. New York, London: Academic Press, INC, 1974/1

6 BROSI, U.:
Beeinflußbarkeit der Lagerungsfähigkeit von Blutkonserven durch K-Mg-Aspartat.
Ein Beitrag zum Energiestoffwechsel
Dissertationsschrift 1977

7 BUDDECKE, E.:
Grundriß der Biochemie
4. Aufl. Berlin: De Gruyter 1974

8 DENNEMANN, H.:
Enzymatische Bestimmung von ATP im Vollblut
Ges. Exp. Med. 134, 335-340 (1961)

9 DERN, R. J., BREWER, G. J., WIORKOWSKI, J. J.:
Studies on the preservation of human blood
J. Lab. Clin. Med. 69, 968-978 (1967)

10 DEUTSCH, E., GEYER, G.:
Laboratoriumsdiagnostik
Buchreihe der Schering AG
2. Aufl. Berlin: Verlag Brüder Hartmann 1975

11 DOKTORANDENKOLLEKTIV DES PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUTS BERLIN:
Verhalten von Enzymen und Substraten bei Konservierung von Blut in verschiedenen Medien, Berlin 1960/61
Folia Haemat. (Leipzig) 78, 620-622 (1962)

12 EATON, J. W., BREWER, G. J.:
Pentose phosphat metabolism
in: SURGENOR, D.: The red blood cell, 436-465
2. Aufl. New York, London: Academic Press, INC, 1974/1

13 FISCHER, H., FERBER, E., WOSEGIEN, F., FRITZSCHE, W., SPIELMANN, W.:
Erythrocytenstoffwechsel und Blutkonservierung
Bibl. Haemat. 12, 76-93 (1961)

14 FLORKIN, M., STOTZ, E. H.:
Comprehensive biochemistry, Vol. 6: Amino acids and related compounds
Amsterdam: Elsevier Publishing Company 1965

15 FOURNELL, A.:
Biochemische Grundlagen der Wirkung von K-Mg-Aspartat
in: BEER, R. und FINSTERER, U.:
Biochemische Eigenschaften und Möglichkeiten der klinischen Anwendung von K-Mg-Aspartat, Kolloquium 25.4.70 in München, 9-14
Aulendorf: Editio Cantor 1971

16 GABRIO, B. W., FINCH, C. A.:
Erythrocyte preservation
I. The relation of the storage lession to in vivo erythrocyte senescence
J. Clin. Invest. 33, 242-247 (1954)

17 GERBER, G., PREISSLER, H., HEINRICH, R., ELSNER, R., RAPOPORT, S.:
A kinetic model of the hexokinase of human erythrocyte and its application to the cell
VII. Internationales Symposium über Struktur und Funktion der Erythrocyten
Berlin 1973, 33-38

18 GREENWALT, T. J., PERRY, S.:
Preservation and utilization of the components of human blood
Prog. Hemat. 6 (185), 148-180 (1969)

19 GROBECKER, H., PIECHOWSKI, U.:
Ionengehalt, Ionentransport und Membran-ATPase der Erythrocyten in Blutkonserven
Z. Klin. Chemie 4, 126-130 (1966)

20 HASART, E., ROIGAS, H.:
Temperaturabhängigkeit der Glycolyse
Folia Haemat. 89, 465-468 (1967)

21 HAUG, H., PUSCH, H. J., GATHOF, A., GATHOF, E.:
Metabolische Veränderungen in gelagertem Konservenblut. Alterung von ACD-konserviertem Blut unter besonderer Berücksichtigung von ATP-, Milchsäure- und Brenztraubensäuregehalt
Fortschr. Med. 90 (24), 862-863 (31.8.72)

22 HELLER, W., JUNGER, H., STOLZ, C., THIEL, B.:
Untersuchungen zum zellulären Eigenstoffwechsel von Konservenblut
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353 (10), 1524 (Oct. 72)

23 HUCKABEE, W. E.:
Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism
I. Effects of infusion of pyruvate or glucose and of hyperventilation
J. Clin. Invest. 37, 244-253 (1958)

24 HURN, B.:
Storage of blood
London: Academic Press 1968

25 JACOBASCH, G.:
Einfluß des Phosphates und des Magnesiums auf die Regulation der Glycolyse
Folia Haemat. 89, 376-391 (1967)

26 JACOBASCH, G., MINAKAMI, S., RAPOPORT, S. M.:
Glycolysis of the erythrocyte
in: YOSHIKAWA / RAPOPORT: Cellular and molecular biology of erythrocytes, 55-92
Tokyo: University Press 1974

27 JACOBASCH, G., SYLLM- RAPOPORT, J., RAPOPORT,S.:
Regulierung der Glycolyse roter Blutzellen im Magnesiummangel
Acta biol. med. germ. 13, 683-692 (1964)

28 JUNGER, H.:
Bluttransfusion und Empfängerorganismus
1. Aufl. Stuttgart: Thieme 1977

29 KARLSON, P.:
Biochemie
8. Aufl. Stuttgart: Thieme 1972

30 KEIDEL, W. D.:
Physiologie
3. Aufl. Stuttgart: Thieme 1973

31 KLÄGER, G.:
Untersuchungen über die Wirkung des Mg-Aspartat-ACD-Stabilisators auf den Kohlenhydratstoffwechsel und die Sauerstofftransportfunktion von Blutkonserven
Dissertationsschrift in Vorbereitung

32 KREYSZIG, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendungen
2. Aufl. Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht 1967

33 LACELLE, P., ROTHSTEIN, A.:
The passiv permeability of the red blood cell to cations
J. Gen. Physiol. 50, 171-188 (1966)

34 LEHNINGER, A. L.:
Biochemie
2. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1977

35 LÖHR, G. W., WALLER, H. D.:
Biochemie der Erythrocytenalterung
Folia Haemat. 78, 385-395 (1972)

36 LUTZEYER, W.:
Die Citratstabilisatoren
Bibl. Haemat. 11, 17-34 (1960)

37 MARCSEK, Z.:
Ober die Bedeutung des Magnesium-stoffwechsels
in: MENZEL, H.: K-Mg-Aspartat zur klinischen Bedeutung von Inzolen in der Intensivmedizin
2. Bielefelder Anästhesiologisches Kolloquium zu Fragen der Intensivmedizin am 17.10.1970, 21-26, Bielefeld 1971

38 MINAKAMI, S., OHYAMA, H., YOSHIKAWA, E.:
Changes of glycolytic intermediates of erythrocytes during storage in acid citrate dextrose medium
Folia Haemat. 91 (1), 115-123 (1969)

39 MINAKAMI, S., TOMODA, A., TSUDA, S.:
Acceleration of red cell glycolysis by citrate due to the elevation of intracellular pH
VII. Internationales Symposium über Struktur und Funktion der Erythrocyten, 53-55, Berlin 1973

40 MIRČEVOVÁ, M.:
Zu einigen Fragen des Zuckermetabolismus in Erythrocyten
Folia Haemat. 78, 463-470 (1962)

41 MOLLISON, P. L. and ROBINSON, M. A.:
Observations on the effects of purine nucleosides on red-cell preservation
Br. J. Haemat. 5, 331-336 (1959)

42 MONCHEN, J.:
Aspartate: Zur klinischen Bedeutung von Inzolen
herausgegeben von Dr. Franz Köhler Chemie, Alsbach/Bergstraße 1970

43 MUNZ, H.:
Dissertationsschrift in Vorbereitung

44 NAKAO, M.:
ATP- requiring phenomena in red cell membranes
in: YOSHIKAWA, H., RAPOPORT, A.: Cellular and molecular biology of erythrocytes, 35-54
1. Aufl. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1974

45 OCKEL, E., RAPOPORT, S., HINTERBERGER, U.:
pH- Abhängigkeit der anaeroben Glycolyse und der Hexokinase
Folia Haemat. (Leipzig) 78, 477-499 (1962)

46 PALEK, J., STEWART, G., LIONETTI, F. J.:
The dependance of shape of human erythrocyte ghosts on calcium, magnesium and ATP
Blood 44, 583-597 (1974)

47 PANIKER, N. V. , BEUTLER, E.:
Pyruvate effect in maintenance of ATP and 2,3 - DPG of stored blood
J. Lab. Clin. Med. 78 (3), 472-482 (Sep. 71)

48 RADERECHT, H. J.:
Stoffwechsel der Blutzellen und seine Beeinflussung unter Konservierungsbedingungen
Folia Haemat. 93, 117-183 (1969)

49 RAPOPORT, S.:
Reifung und Alterungsvorgänge in Erythrocyten
Folia Haemat. 78, 363-380 (1962)

50 RAPOPORT, S.:
Stoffwechselregulation in Erythrocyten
Folia Haemat. 83, 298-312 (1965)

51 RAPOPORT, S.:
Regulation of metabolism in red cells
Bibl. Haemat. 29, 133-145 (1966)

52 RAPOPORT, S.:
Medizinische Biochemie
6. Aufl. Berlin: VED Verlag Volk und Gesundheit 1945

53 RAPOPORT, S., ABABEI, L.:
Die Enzymregulation auf dem Niveau der Lactatdehydrogenase
NADH-NADPH-Oxydasen sowie NADP-Oxyreduktasen in roten Blutzellen
Acta biol. med. germ. 13, 852-864 (1964)

54 RICHTERICH, R.:
Klinische Chemie
3. Aufl. Basel, München, Paris, London, New York, Sydney: S. Karger 1971

55 RICK, W.:
Klinische Chemie und Mikroskopie
4. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1976

56 RING, K., GRIMM, E., SCHWARZ, M.:
Wechselwirkungen zwischen L-Aspartat und Kaliumionen beim Transport in lebende Zellen
in: KRONSCHWITZ, H.: K-Mg-Zn-Aspartat
15. Kolloquium am 15.3.1975 in Frankfurt/Main, 3-22 (1976)

57 ROIGAS, H., STRAUSS, D., RADERECHT, H. J., HOECKENDORFF, J.:
Verbesserte Blutkonservierung durch Zusätze von Adenin und Guanosin
Z. Gesamte Inn. Med. 24 (23), 850-856 (1. Dec. 69)

58 SACHS, J. R., KNAUF, P. A., DUNHAM, P. B.:
Transport through redcell membranes
in: SURGENOR, D.: The red blood cell, 613-695
2. Aufl. New York, London: Academic Press, INC 1974/2

59 SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethoden
1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1968

60 SASS, M. D., CARUSO, C. J., AXELFOD, D. R.:
Deterioration of young and old red cells stored ad $4^{o}C$
Vox sang. 21, 327-337 (1971)

61 SCHAIBLE, H. G.:
Stoffwechseluntersuchungen in konserviertem Vollblut unter Zusatz von Mg-Aspartat
Dissertationsschrift in Vorbereitung

62 SCHMITT, H.:
Läßt sich die Lagerungsfähigkeit von Blut durch Nukleoside verlängern?
Bibl. Haemat. 12, 94-104 (1961)

63 SEBENING, F., STRUCK, E. M., REYMANN, B.:
Kalium-Substitution durch Kalium-Lactat oder -Asparaginat bei Operationen mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine
Arzneimittel-Forschung (Drug. Res.) 3, 347-350 (1968)

64 SPIELMANN, W.:
Transfusionskunde
2. Aufl. Stuttgart: Thieme 1972

65 STIGGE, V., LUN, A., ZIEMER, S., STRAUSS, D., RADERECHT, H.J.:
Weitere Optimierung der ACD-AG-Konservierungslösung für Blut
1. Verbesserung der Sauerstofftransportfunktion der Erythrocyten durch Zusatz von Pyruvat und Xylit
Folia Haemat. (Leipzig) 101 (2), 256-268 (1974)

66 STRAUSS, D., RADERECHT, H. J.:
Über biochemische Kriterien der Haltbarkeit von Testerythrocyten während der Lagerung bei 4°C in einem phosphat- und nukleosidhaltigen Medium
Z. Ges. Inn. Med. 24 (24), 897-902 (15. Dec. 69)

67 STRUCK, E., MEISNER, H., SCHMIDT-HABELMANN, P., SEBENING, F.:
Die Bedeutung von Magnesium im postoperativen Stoffwechsel
in: KRONSCHWITZ, H.: K-Mg-Zn-Aspartat, 15. Kolloquium am 15.3.1975 in Frankfurt/Main, 158-179, Frankfurt 1975

68 SYLLM-RAPOPORT, I., STRASSBURGER, J., RAPOPORT,S.:
Glycolyse von Erythrocyten bei Magnesiummangel
Folia Haemat. 78, 474-476 (1962)

69 DE VERDIER, C. H.:
Functional properties of stored red cells
Vox. sang. 16, 361-372 (April 69)

70 DE VERDIER, C. H., GARBY, L.:
Blood preservation
in: YOSHIKAWA, H., RAPOPORT, S. M.: Cellular and molecular biology of erythrocytes, 409-425
1. Aufl. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1974

71 WEED, R., LACELLE, P., MERRILL, E.:
Metabolic dependance of redcell deformability
J. Clin. Invest. 48, 795-809 (1969)

72 WILLENEGGER, H.:
Historisches und Grundsätzliches zur Frage des idealen Stabilisators
Bibl. Haemat. 11, 4-15 (1960)

73 YOSHIKAWA, H., MINAKAMI, S.:
Metabolic changes in stored blood
Bibl. Haemat. 29, 168-177 (1968)

74 YOSHIKAWA, H., MINAKAMI, S.:
Regulation of glycolysis in human red cells
Folia Haemat. 89, 357-375 (1968)

75 YOSHIKAWA, H., NAKAO, M.:
Nucleotide metabolism and its relation to functions of preserved human erythrocytes
Folia Haemat. (Leipzig) 78, 518-523 (1962)

Herrn Professor Dr. Heller danke ich für die stets freundliche Betreuung während der Zeit im Labor und bei der Zusammenstellung der Arbeit,
Herrn Dr. Schenzle (Zentrum für Medizinische Datenverarbeitung der Universität Tübingen) für seine Beratung bei allen statistischen Problemen
und meiner Kollegin H. Munz für die gute Zusammenarbeit.

LEBENSLAUF

Am 25. Mai 1955 wurde ich, Sigrid Ortrun Foth, als ältestes der drei Kinder von Dr. Wilhelm Foth, Studiendirektor, und Sigrid Foth, geb. Erbe, Lehrerin, in Balingen, Kreis Balingen, geboren.

Am 3. Mai 1962 wurde ich in die Grundschule Balingen eingeschult, am 19. April 1966 wechselte ich auf das dortige Gymnasium über, das ich am 12. Juni 1974 nach der Reifeprüfung verließ.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen auf. Im August 1976 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab, im August 1977 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung, im März 1980 den zweiten Abschnitt und am 14. April 1981 den dritten Abschnitt.

Während meines Studiums machte ich in der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen wissenschaftliche Untersuchungen über die Wirkung eines Histidin - ACD - Stabilisators auf den Kohlenhydrat - und Energiestoffwechsel von Blutkonserven und faßte sie zu vorliegender Arbeit zusammen.